

博 士 学 位 論 文

ドパミンの脳内サイトカイン産生抑制作用に関する研究

杉 野 佑 太

摂南大学大学院
薬学研究所

目次

緒論	1
本論	
第 1 章 ミクログリアにおけるドパミンによる NO 及び炎症性サイトカイン 産生抑制作用	3
実験方法	4
実験結果	
1.1 マウスミクログリア株 BV-2 細胞における LPS 刺激による NO 及び 炎症性サイトカイン産生に対するドパミンの作用	9
1.2 BV-2 細胞におけるドパミンによる NO 産生抑制作用及びサイトカイン 発現誘導抑制作用へのドパミン受容体の関与	12
1.3 BV-2 細胞におけるドパミンによる NO 産生抑制作用及びサイトカイン 発現誘導抑制作用への活性酸素種及びドパミンキノンの関与	16
1.4 BV-2 細胞における LPS 刺激による NF- κ B p65 の活性化に対する ドパミンの影響	23
1.5 BV-2 細胞におけるドパミンによる NF- κ B p65 の核移行抑制機構	26
1.6 マウス初代培養ミクログリアにおける LPS 刺激による NO 産生及び サイトカイン発現誘導に対するドパミンの影響	33
考察	37
第 2 章 脳内の炎症性サイトカイン産生に対するドパミンの影響	40
実験方法	41
実験結果	
2.1 脳内での炎症性サイトカイン産生に対するドパミン神経障害の影響	45
2.2 脳内での炎症性サイトカイン産生に対する L-dopa 投与の影響	49
2.3 LPS 線条体内投与による線条体でのサイトカイン産生及びドパミン 神経障害に対する L-dopa/carbidopa 前投与の影響	54
考察	57
総括	59
謝辞	62
引用文献	63

緒論

脳は、神経細胞とグリア細胞により構成されており、アストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞は、脳の恒常性の維持に重要な役割を担っている^{1,2)}。グリア細胞は、神経栄養因子やサイトカインなどの様々な生理活性物質を介して、神経細胞と相互に機能制御を行っており、神経細胞の分化や形態形成、シナプス形成がグリア細胞により調節されている³⁻⁵⁾。ミクログリアは、種々の刺激により活性化され、細胞死を起こした神経細胞や脳内に蓄積した β -アミロイドタンパク質などの異常代謝産物を貪食することにより、脳内の不要物を除去する役割を担っている^{6,7)}。また、活性化ミクログリアは、一酸化窒素 (NO) 等の活性酸素種や炎症性サイトカインの産生を介して抗菌作用や抗ウイルス作用を示し、脳の感染防御に中心的な役割を果たしている⁸⁾。

NO は、内皮型、神経型及び誘導型の 3 種類の NO 合成酵素 (NO synthase; NOS) によりアルギニンにより産生され、生体内で多彩な生理作用を発揮している⁹⁾。また、NO は、脳内において神経伝達物質として働き、記憶・学習に重要な役割を果たしている¹⁰⁾。炎症性サイトカインは、種々の免疫担当細胞から分泌される糖蛋白質であり、免疫・炎症・生体防御において重要な役割を担っている¹¹⁻¹⁴⁾。一方、パーキンソン病やアルツハイマー病等の神経変性疾患患者の脳内の病変部位において、NO 産生の指標であるニトロチロシン量が増加すること、TNF- α や IL-1 β 等の炎症性サイトカインが増加することが報告されている¹⁵⁻²⁰⁾。また、*in vitro* の実験において、高濃度の NO や TNF- α 、IL-1 β が、種々の神経細胞に細胞死を誘導することから²¹⁻²³⁾、活性化ミクログリアにより産生された過剰な NO や炎症性サイトカインが、神経変性疾患における神経細胞死の一因であると考えられている。

近年、ミクログリアには、ニコチン性アセチルコリン受容体やグルタミン酸受容体等の種々の神経伝達物質受容体が発現していることが明らかとなり、神経伝達物質によるミクログリアの機能調節が注目されている²⁴⁻²⁶⁾。ドパミンは、運動機能制御や認知機能など中枢機能の調節に関与する神経伝達物質である²⁷⁾。ドパミンはシナプスのみならず、ドパミン神経の軸索瘤、細胞体や樹状突起からも放出され²⁸⁾、放出部位から比較的離れた受容体にも作用することから²⁹⁾、神経細胞だけでなくグリア細胞の機能調節にも関与することが示唆されており、実際に、ドパミンがミクログリアの遊走を惹起することが報告されている³⁰⁾。また、ドパミンの放出は脳虚血後に増加すること、外傷性脳傷害後に減少することが報告されている^{31, 32)}。これらのことから、脳障害の病態生理を解明するにあたり、ドパミンによるミクログリアの機能調節を明らかにすることは重要であると考えられるが、ミクログリアによる NO や炎症性サイトカイン産生に対するドパミンの影響はほとんど明らかにされていない。

本研究では、ミクログリアによる NO や炎症性サイトカイン産生に対するドパミンの影響について、*in vitro* 及び *in vivo* の系を用いて検討した。

The abbreviations used are: NOS, NO synthase; eNOS, endothelial NOS; nNOS, neuronal NOS; iNOS, inducible NOS; FBS, fetal bovine serum; DMEM, Dulbecco Modified Eagle's Medium; LPS, lipopolysaccharide; DA, dopamine; NAC, N-Acetyl-L-cysteine; SCH-23390, 7-chloro-3-methyl-1-phenyl-1,2,4,5-tetrahydro-3-benzazepin-8-ol; Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethane; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; NP-40, Nonidet P-40; DMSO, dimethylsulfoxide; CY208-243, 4,6,6a,7,8,12b-hexahydro-7-methylindolo(4,3-ab)-phenanthridine; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; I κ B α , inhibitor-kappa B α ; MAPK, mitogen-activated protein kinase; GM-CSF, Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor; Iba-1, Ionized calcium-binding adapter molecule 1; PBS, phosphate-buffered saline; TBS, Tris-buffered saline; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1; MPTP, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; MAO-B, monoamine oxidase-B; L-dopa, L-3,4-dihydroxyphenylalanine; TH, tyrosine hydroxylase; DAT, dopamine transporter.

本論

第 1 章 ミクログリアにおけるドパミンによる NO 及び炎症性サイトカイン 産生抑制作用

NO は生体内で NOS によりアルギニンから産生される³³⁾。NOS には、内皮型 (endothelial NOS; eNOS)、神経型 (neuronal NOS; nNOS) 及び誘導型 (inducible NOS; iNOS) の 3 種類が存在している³⁴⁾。iNOS は、eNOS や nNOS とは異なり、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動に影響されずに NO を産生することが報告されており^{35, 36)}、eNOS や nNOS と比較して、多量の NO を産生することが知られている³⁷⁾。また、ミクログリアでは、LPS やサイトカイン等の活性化刺激により iNOS が誘導され、NO が産生されることが報告されており^{38, 39)}、ミクログリアが産生した NO は抗菌作用や抗ウイルス作用により脳の感染防御に重要な役割を果たすと考えられている⁷⁾。サイトカインは、分子量 8-30 kDa の糖蛋白質であり、免疫系の調節、炎症反応の惹起、細胞の増殖や分化の調整、抗腫瘍作用に関係し、感染防御、生体機能の調節等に重要な役割を果たしている^{40, 41)}。ミクログリアでは、LPS 等の活性化刺激により TNF- α 、IL-1 β や IL-6 等の炎症性サイトカインが産生されることが知られており^{42, 43)}、ミクログリアにより産生された炎症性サイトカインは、脳の感染防御等に深く関与すると考えられている⁴⁴⁾。一方、高濃度の NO は、種々の神経細胞に細胞死を誘導することが知られている^{45, 46)}。また、炎症性サイトカインはパーキンソン病やアルツハイマー病等の神経変性疾患での神経細胞傷害、神経因性疼痛に深く関与すると考えられている⁴⁷⁻⁴⁹⁾。このように、脳内で産生された NO 及び炎症性サイトカインは、有益な作用と有害な作用の二面性を有している。

ドパミンは、自発運動活性、認知・学習機能、情動反応、摂食行動、内分泌調節等に関わる神経伝達物質であり、ドパミンの生理作用は、主に G 蛋白質共役型である D_1 様及び D_2 様受容体を介して誘導される⁵⁰⁾。一方、ドパミンの作用には、ドパミン受容体を介さない作用も示されている。ドパミンは容易にドパミンキノンへと酸化され⁵¹⁾、このドパミンキノンは蛋白質のシステイン残基と反応して結合し、その蛋白質の機能を修飾することが知られている⁵²⁻⁵⁴⁾。

本章では、マウスミクログリア株 BV-2 細胞やマウス初代培養ミクログリア細胞を用いて、LPS 刺激による NO 及び炎症性サイトカイン産生に対するドパミンの影響について検討した。

実験方法

1) 薬物及び抗体

ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum; FBS) は Nichirei Bioscience Inc. (Tokyo, Japan) より購入した。Streptomycin/penicillin 溶液、fungizone、Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM)、Trypsin-EDTA 溶液、lipopolysaccharide (LPS, 0111:B4)、ドパミン、N-Acetyl-L-cysteine (NAC)、7-chloro-3-methyl-1-phenyl-1,2,4,5-tetrahydro-3-benzazepin-8-ol (SCH-23390)、sulpiride、チロシナーゼ及び Hoechst 33342 は Sigma (St. Louise, MO, USA) より購入した。Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)、glycine、フッ化ナトリウム (NaF)、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、sodium dodecyl sulfate (SDS)、KCl、Nonidet P-40 (NP-40)、sodium deoxycholate、aprotinin、dimethylsulfoxide (DMSO) 及び N-1-Naphthylethylenediamine Dihydrochloride は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より購入した。4,6,6a,7,8,12b-hexahydro-7-methylindolo(4,3-ab)-phenanthridine (CY208-243) は Tocris (Missouri, MN, USA) より購入した。Tween-20 及び Triton-X 100 は ICN Biomedicals Inc (Aurora, OH, USA) より購入した。抗 iNOS 抗体、抗 nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 抗体、抗 inhibitor-kappa B α (I κ B α) 抗体及び抗 β -tubulin 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。抗リン酸化 p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 抗体、抗 p38 MAPK 抗体、抗リン酸化 Smad2 抗体及び抗 Smad2 抗体は Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA) より購入した。pNF- κ B vector は Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto, CA, USA) より購入した。Lipofectamine LTX は Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) より購入した。Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF) は PEPROTECH (Rocky Hill, NJ, USA) より購入した。Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) 抗体及びその他の試薬は Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan) より購入した。

2) 細胞培養

マウスミクログリア株 BV-2 細胞は、10% FBS、100 μ g/mL streptomycin、100 IU/mL penicillin、1 μ g/mL fungizone を含む DMEM (10% FBS/DMEM) 中にて 5% CO₂/95% air、37°C で培養した。Griess 法及びルシフェラーゼレポータージェンアッセイには、 1×10^5 cells/well の密度で 24 well plate に、免疫染色には、 1×10^5 cells/well の密度で 15 mm coverslip を入れた 24 well plate に、RT-PCR 法、real-time RT-PCR 法、NBT/glycinate assay 及び Western blotting には、 6×10^5 cells/dish の密度で 60 mm dish にそれぞれ播種した。

3) マウス初代培養ミクログリアの調製

生後 0-3 日のマウスから脳を摘出し、細断後、10 mL の 10% FBS/DMEM に懸濁し、800 \times rpm で 5 分間遠心した。上清を除去後、沈殿した細胞に 5 mL の phosphate-buffered saline (PBS) (-) を加え洗浄し、800 \times rpm で 5 分間遠心した。上清を除去後、沈殿した細

胞を 5 mL の 0.25% Trypsin-EDTA 溶液で分散し、37°C で 5 分間インキュベートした後、Trypsine-EDTA 溶液と同量の 10% FBS/DMEM を加え反応を停止させた。800 × rpm で 5 分間遠心後、上清を除去し、沈殿した細胞を 10 mL の 10% FBS/DMEM に懸濁し、これを 100 μm セルストレイナー (FALCON) に通した後、75 cm² フラスコに播種し、5% CO₂/95% air、37°C で培養した。培養 14-20 日後に、0.5 ng/mL GM-CSF を添加し 2-3 日培養した。その後、振とう (200 rpm, 2 時間) によりアストロサイト上で増加したミクログリアを分離、回収し、100 mm Petri dish に移し、5% CO₂/95% air、37°C で 30 分インキュベートした。5 mL の PBS (-) で洗浄することにより接着していない細胞を除去した後、シリコンラバーで搔爬することにより細胞を回収し、Griess 法には 1 × 10⁵ cells/well の密度で 24 well plate に、real-time RT-PCR 法及び Western blotting には 3 × 10⁵ cells/dish の密度で 60 mm dish に播種した。研究で使用した細胞は、95% 以上が Iba-1 陽性を示すミクログリアであった。

4) 薬物処置

ドパミンは、細胞播種 24 時間後に培養液をドパミンを含む培養液へと置換し、24 時間処置した。SCH-23390、sulpiride、NAC 及びアスコルビン酸は、ドパミン処置の 1 時間前に培養液に添加し、ドパミンと共存させた。また、LPS は、細胞播種 48 時間後に培養液を除去し、LPS を含む培養液へと置換することにより処置した。ビンブラスチンは、LPS 処置の 2 時間前に培養液に添加し、LPS と共存させた。チロシナーゼは、チロシン及びフェノールレッドを含まない培養液に希釈し、培養液を除去した後、処置した。

5) Griess 法

薬物処置後、100 μL の培養上清を 100 μL の Griess 試薬 (1% sulfanilamide、0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride、2.5% H₃PO₄) と 96 well plate 中で混合し、室温で 10 分間静置後、吸光度 (λ = 570 nm) を測定した。亜硝酸イオン (NO₂⁻) の標準液として、NaNO₂ 溶液を用いて検量線を作成し、培養液中の NO₂⁻ 量を算出した。

6) RNA の調製

薬物処置後、細胞を氷冷 PBS (-) で 2 回洗浄し、175 μL の SV RNA Lysis Buffer で溶解し、SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて、RNA を調製した。

7) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 及び real-time RT-PCR 法

RNA を、吸光度測定により定量し、滅菌水を加えて 1 μg RNA/8.8 μL になるように希釈した。そこに、0.1 g/L ランダムプライマー (dN6)、5 × 1st strand、0.1 M DTT、5 mM dNTP を各 2 μL、4 μL、2 μL、2 μL 加え混合した。さらに、M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) 1 μL を加え、逆転写反応を行った (37°C、60 分)。RT-PCR は、逆転写反応産物を滅菌水で 20 倍希釈した後、希釈液 2 μL に下記の通りの各ドパミン受容体の forward 及び reverse

のプライマーを 1.4 μ L ずつと、Taq DNA polymerase を含む酵素溶液を 7 μ L 加え、下記の条件で PCR を行った。PCR 産物を、ethidium bromide を含む 2% agarose/TBE gel を用いて電気泳動した後、UV 260 nm 励起により可視化した。Real-time RT-PCR は、逆転写反応産物を滅菌水で 20 倍希釈した後、希釈液 2 μ L に下記の通りの各サイトカイン及び iNOS の forward 及び reverse のプライマーを 1 μ L ずつと、SYBR Green を含む酵素溶液を 5 μ L 加え、下記の条件で行った。各遺伝子発現量は、 β -actin の遺伝子発現量で補正することによりグラフ化した。

PCR 条件

- ・ D₁、D₂、D₃、D₄、D₅ receptor
(55°C 2 分、95°C 10 分を 1 サイクル、95°C 15 秒、55°C 1 分を 40 サイクル)
- ・ β -actin、TNF- α 、IL-1 β
(95°C 10 秒、55°C 20 秒、72°C 20 秒を 40 サイクル)
- ・ IL-6、iNOS
(95°C 10 秒、53°C 20 秒、72°C 20 秒を 40 サイクル)

プライマーデザイン

Gene	Sequence
D ₁ receptor forward	5'-AAC TGT ATG GTG CCC TTC TGT GG-3'
D ₁ receptor reverse	5'-GCC CCG TTG TTG TTG ATG CTT AC-3'
D ₂ receptor forward	5'-CAC TCC GCC ACT TCT TGA CAT ACA-3'
D ₂ receptor reverse	5'-AGC CCC ATC CAC AGC CTC CTC T-3'
D ₃ receptor forward	5'-GTC CTG CCC TCT CCT CTT TGG TTT-3'
D ₃ receptor reverse	5'-CAT TTG TCC CGT GGC ATC TGA-3'
D ₄ receptor forward	5'-TGC CCT CAA CCC CAT CAT CTA CAC-3'
D ₄ receptor reverse	5'-TCC CAA CCC CCA GCC TTC ATA A-3'
D ₅ receptor forward	5'-GGG AGA TCG CTG CTG CCT ATG TC-3'
D ₅ receptor reverse	5'-ATT GGG GGT GAG TGG TGA GAT TTT-3'
β -actin forward	5'-ATG GGT CAG AAG GAC TCC TAC-3'
β -actin reverse	5'-ACG CTC GGT CAG GAT CTT CAT-3'
TNF- α forward	5'-CGG GGT GAT CGG TCC CCA AAG-3'
TNF- α reverse	5'-GGA GGG CGT TGG CGC GCT GG-3'
IL-1 β forward	5'-CCT CTC CAG CCA AGC TTC CT-3'
IL-1 β reverse	5'-TTT GGA AGC AGC CCT TCA TC-3'
IL-6 forward	5'-TTC TAC CCC AAT TTC CAA TGC-3'
IL-6 reverse	5'-CAT AAC GCA CTA GGT TTG CCG-3'
iNOS forward	5'-ACA TCG ACC CGT CCA CAG TAT-3'
iNOS reverse	5'-CAG AGG GGT AGG CTT GTC TC-3'

8) NBT/glycinate assay

キノプロテイン量の測定は、NBT/glycinate assay により行った⁵⁵⁾。薬物処置後、細胞を氷冷 PBS (-) で 2 回洗浄し、4°C、1000 × g で 5 分間遠心することにより細胞を回収した。細胞に 100 μL の lysis buffer (137 mM NaCl、8.1 mM Na₂HPO₄·12H₂O、2.68 mM KCl、1.47 mM KH₂PO₄、1% NP-40) を加え、20 分間氷上に静置して可溶化し、試料とした。試料を蛋白質定量した後、400 μg の蛋白質を含む試料 200 μL を、1 mL の NBT/glycinate 溶液 (0.24 mM NBT、2 M potassium glycinate、pH 10.0) と混合し、暗室で穏やかに振とうしながら 2 時間インキュベートした。17,400 × g で 5 分間遠心することにより、生成した NBT ホルマゼンを沈降し、沈査を 2 N HCl で洗浄した後、300 μL の DMSO で可溶化した。吸光度 (λ = 530 nm) を測定し、キノプロテイン量を算出した。

9) トランスフェクション及び luciferase reporter gene assay

BV-2 細胞播種 24 時間後に、Lipofectamine LTX を用いて pNF-κB vector (0.5 μg/well) をトランスフェクションした。トランスフェクションは、Invitrogen 社の推奨方法に従って行い、トランスフェクション 24 時間後から薬物処置を開始した。薬物処置後、細胞を氷冷 PBS (-) で 2 回洗浄し、100 μL の Passive Lysis Buffer (Promega) で可溶化し、試料とした。試料を蛋白質定量後、ルシフェラーゼ活性を Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて、ルミノメーターにより測定した。

10) 細胞分画

薬物処置後、細胞を氷冷 PBS (-) で 2 回洗浄、スクレーパーで搔破し、4°C、500 × g で 5 分間遠心することにより細胞を回収した。細胞に、100 μL の lysis buffer (10 mM HEPES-HCl、1% NP-40、1.5 mM MgCl₂、10 mM KCl、500 μM dithiothreitol、1 mM PMSF、pH 7.5) を加え、氷中で 20 分間静置した後、500 × g で 5 分間遠心し、上清を細胞質画分とした。沈査を 100 μL の lysis buffer で洗浄した後、500 × g で 5 分間遠心し、上清を除去した。沈査に 50 μL の SDS lysis buffer (20 mM Tris-HCl、2% SDS、pH 7.5) を加え、10 分間ボーリングした。17,400 × g で 5 分間遠心し、上清を核画分とした。細胞に 100 μL の SDS lysis buffer を加え、10 分間ボーリングした後、室温、17,400 × g で 5 分間遠心し、その上清を whole cell lysate とした。

11) Western blotting

薬物処置後、細胞を氷冷 PBS (-) で 2 回洗浄、スクレーパーで搔破し、4°C、1000 × g で 5 分間遠心することにより細胞を回収した。細胞に等張の 100 μL の lysis buffer (50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS、10 μg/mL aprotinin、100 μM PMSF) を加え、20 分間氷上に放置して可溶化した。17,400 × g で 5 分間遠心し、上清を iNOS を検出するための試料とした。本試料及び細胞分画後の各画分は、蛋白質定

量した後、5 × Laemmli buffer (125 mM Tris-HCl, 25% glycerol, 5% SDS, 0.2% bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol, pH 7.5) を加えて 5 分間ボイリングを行い、蛋白質を変性させた。等量の蛋白質 (1-30 µg) を SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った後、immobilon-P transfer membrane (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) に転写した。その membrane を 0.5-5% skim milk と 0.05% Tween-20 を含む Tris-buffered saline (TBS; TBS-T) で blocking 後、TBS-T で membrane を洗浄し (室温、5 分 × 3 回)、skim milk を含む TBS-T で希釈した一次抗体 (下記) と反応させた (4 °C、overnight)。その後、TBS-T で membrane を洗浄し (室温、5 分 × 3 回)、skim milk を含む TBS-T で希釈した二次抗体 (下記) と反応させた。TBS-T で洗浄 (室温、10 分 × 3 回) した後、Enhanced Chemi-Luminescence (ECL) 法により蛋白質バンドを X 線フィルム (Fujifilm. Co. Ltd., Tokyo, Japan) に検出した。

一次抗体 抗 iNOS 抗体 (1:1000)

抗 NF-κB p65 抗体 (1:5000)

抗 IκBα 抗体 (1:2000)

抗リン酸化 p38 MAPK 抗体 (1:2000)

抗 p38 MAPK 抗体 (1:2000)

抗リン酸化 Smad2 抗体 (1:2000)

抗 Smad2 抗体 (1:2000)

二次抗体 HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体 (1:1000, Cappel, Durham, NC, USA)

12) 間接蛍光抗体法による細胞染色

15 mm coverslip 上で培養した細胞を、薬物処置後、PBS (-) で 2 回洗浄し、3.7% formaldehyde で固定した (室温、15 分間)。洗浄後、0.1% Triton-X 100 を含む Tris-buffered saline (TBS) で細胞を permeabilize した (室温、15 分間)。染色には、一次抗体として抗 NF-κB p65 抗体 (1:300) 及び抗 β-tubulin 抗体 (1:200) を用いた。また二次抗体として、Alexa Fluor 568 標識抗 rabbit IgG 抗体 (1:300, Invitrogen) 及び FITC 標識抗 mouse IgG 抗体 (1:200, Cappel) を用いた。Hoechst 33342 を用いて核の染色を行った後、coverslip をスライドガラス上にマウントし、共焦点レーザー顕微鏡により細胞を観察した。

13) データ解析

実験結果は、3-4 例の平均値 ± S.E.M. として表した。有意差検定は ANOVA を行い、post-hoc test として Scheffe's test または Dunnett's test を行った。

実験結果

1.1 マウスミクログリア株 BV-2 細胞における LPS 刺激による NO 及び炎症性サイトカイン産生に対するドパミンの作用

ミクログリアにおいて、LPS は NO 産生及び TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等の炎症性サイトカインの発現を誘導することが知られている^{42, 43)}。ミクログリアにおけるこれら炎症性因子の産生に対するドパミンの影響を検討する目的で、マウスミクログリア株 BV-2 細胞での LPS 刺激による NO 産生について、Griess 法により検討した。

BV-2 細胞において、LPS (0.001-1 μ g/mL) を 24 時間処置することにより、濃度依存的に NO 産生量は増加した (Fig. 1A)。次に、LPS 刺激による NO 産生量の増加に対するドパミンの影響を検討した結果、ドパミン (1-100 μ M) を 24 時間前処置することにより、その濃度依存的に LPS 刺激による NO 産生量の増加は抑制された (Fig. 1B)。さらに、LPS 刺激による iNOS の発現誘導に対するドパミンの影響について、Western blotting により検討した結果、LPS (0.1 μ g/mL) の 24 時間処置による iNOS の発現量の増加は、ドパミン (1-100 μ M) の前処置により濃度依存的に抑制された (Fig. 1C)。

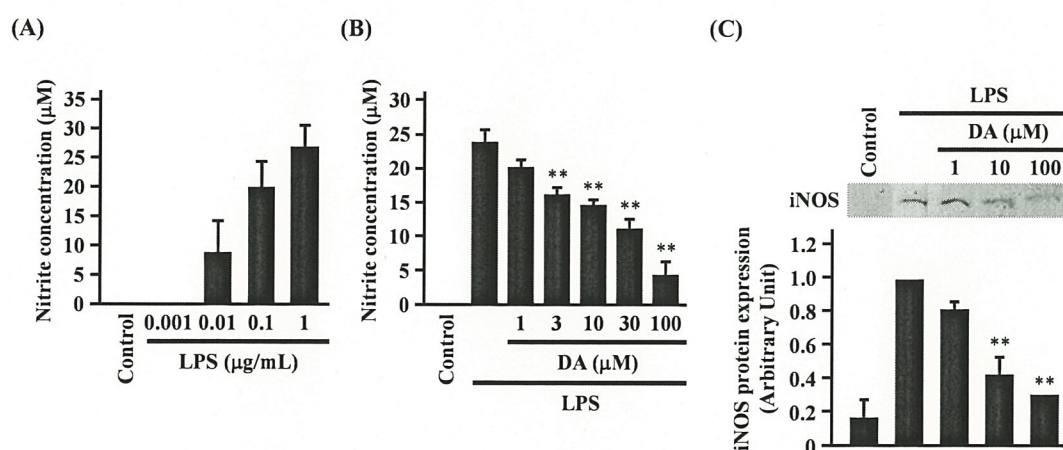


Figure. 1 Dopamine (DA) attenuates LPS-induced NO production by inhibiting the induction of iNOS in BV-2 cells.

(A) Cells were treated with LPS at the indicated concentrations for 24 h. The nitrate levels were determined by Griess assay. (B-C) Cells were treated with DA at the indicated concentrations for 24 h. Then the cells were treated with 0.1 μ g/mL LPS for 24 h. The nitrate levels (B) and iNOS protein (C) were examined by Griess assay and Western blotting, respectively. Relative intensity of iNOS protein band was quantitated by using a densitometer. The levels of iNOS protein (C) were expressed as relative to the maximum expression level, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 3 to 4 independent experiments (A-C) and blots representative of 4 independent experiments (C). ** P < 0.01 vs. 0.1 μ g/mL LPS

次に、BV-2 細胞での LPS 刺激によるサイトカイン及び iNOS mRNA 量について、real-time RT-PCR 法により検討した。BV-2 細胞において、LPS (0.01-10 $\mu\text{g/mL}$) を 9 時間処置することにより、濃度依存的に TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及び iNOS mRNA 量は増加した (Fig. 2A - D)。次に、LPS 刺激によるサイトカイン及び iNOS mRNA の発現誘導に対するドパミンの影響を検討した結果、ドパミン (1-30 μM) を前処置することにより、その濃度依存的に LPS 刺激によるサイトカイン mRNA の発現誘導は抑制された (Fig. 3A - C)。また、LPS 刺激による iNOS mRNA の発現誘導も、NO 産生と同様に、ドパミン (1-30 μM) 前処置により抑制された (Fig. 3D)。

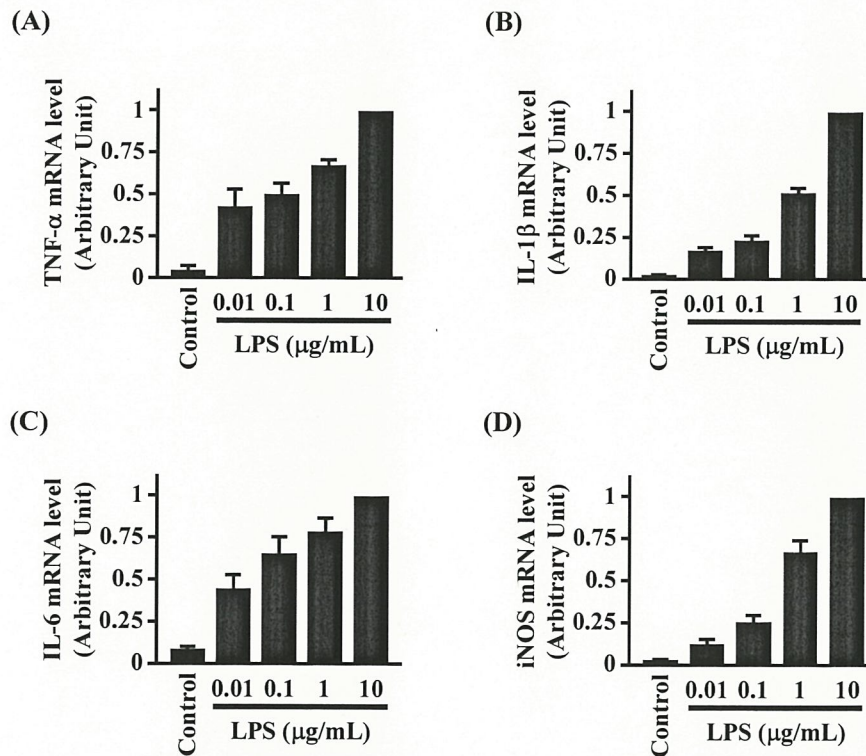


Figure. 2 LPS induces mRNA expression of cytokines and iNOS in BV-2 cells.

Cells were treated with LPS at the indicated concentrations for 9 h. The mRNA levels of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) and iNOS (D) were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of cytokines and iNOS were normalized to β -actin and were expressed as relative to the maximum expression level, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 3 independent experiments

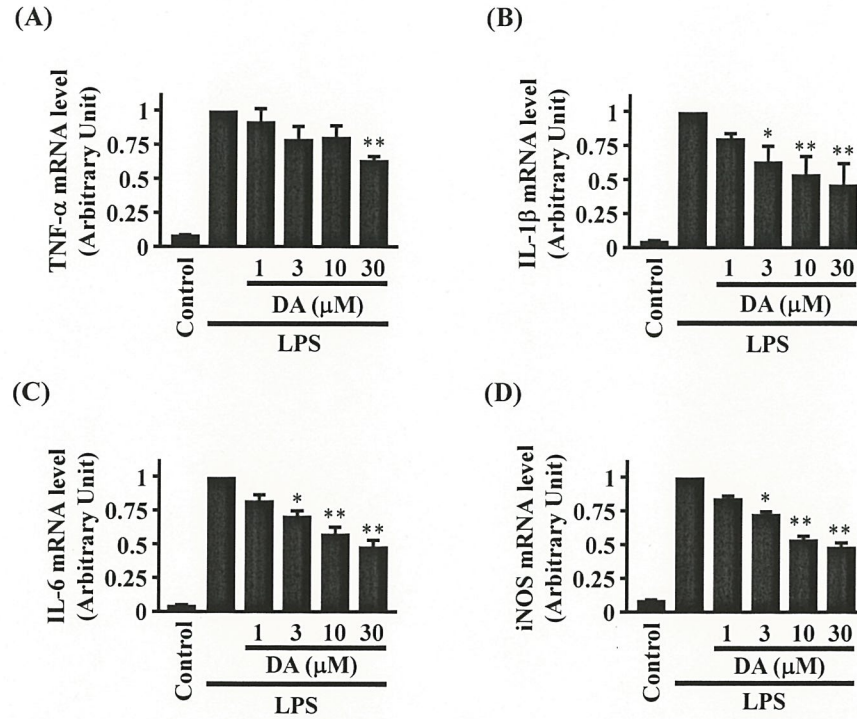


Figure. 3 Effect of pretreatment with DA on LPS-induced mRNA expressions of cytokines and iNOS in BV-2 cells.

Cells were treated with DA at the indicated concentrations for 24 h. Then the cells were treated with 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS for 9 h. The mRNA levels of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) and iNOS (D) were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of cytokines and iNOS were normalized to β -actin and were expressed as relative to the maximum expression level, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 3 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS

1.2 BV-2 細胞におけるドパミンによる NO 産生抑制作用及びサイトカイン発現誘導抑制作用へのドパミン受容体の関与

BV-2 細胞におけるドパミンによる NO 産生抑制作用及びサイトカイン mRNA 発現誘導抑制作用が、ドパミン受容体を介しているか否かを明らかにする目的で、BV-2 細胞でのドパミン受容体の発現について、RT-PCR 法により検討した。

BV-2 細胞において、D₂ 及び D₅ 受容体 mRNA の発現がみられたが、D₁、D₃ 及び D₄ 受容体 mRNA の発現はみられなかった (Fig. 4)。また、マウス初代培養ミクログリアでのドパミン受容体の発現について検討した結果、D₁ 及び D₂ 受容体 mRNA の発現がみられたが、D₃、D₄ 及び D₅ 受容体 mRNA の発現はみられなかった (Fig. 4)。

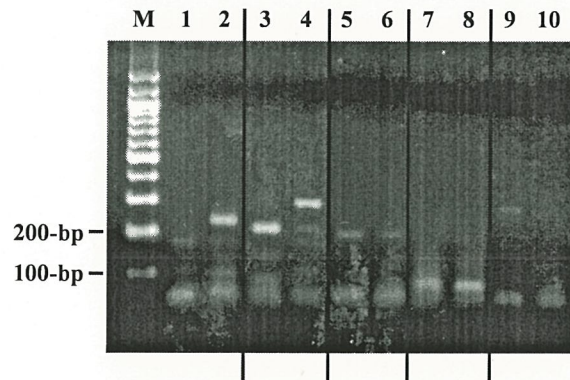


Figure. 4 RNA expression of DA receptor subunits in BV-2 cells and mouse primary microglial cells. The mRNA expressions of D₁-like and D₂-like DA receptors in BV-2 cells and mouse primary microglial cells were examined by RT-PCR analysis. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products of D₁ (230 bp; lane 1 and 2), D₂ (208 bp; lane 3 and 4), D₃ (310 bp; lane 5 and 6), D₄ (202 bp; lane 7 and 8), and D₅ (221 bp; lane 9 and 10) DA receptors of BV-2 cells (lane 1, 3, 5, 7 and 9) and mouse primary microglial cells (lane 2, 4, 6, 8 and 10) is shown. Lane M represents 100-bp DNA ladder marker. Results show representative results of 4 independent experiments.

次に、BV-2 細胞におけるドパミンによる NO 産生抑制作用が、ドパミン受容体を介した作用であるか否かを明らかにする目的で、ドパミン受容体遮断薬及び作用薬の影響を検討した。D₁ 様受容体 (D₁、D₅ 受容体) 遮断薬 SCH-23390 (10-30 μ M) 及び D₂ 様受容体 (D₂、D₃、D₄ 受容体) 遮断薬 sulpiride (10-30 μ M) はいずれも、ドパミン (10 μ M) 前処置による NO 産生抑制作用に影響を与えなかった (Fig. 5A)。また、D₁ 様受容体作用薬 CY208-243 (1-10 μ M) 及び D₂ 様受容体作用薬 bromocriptine (1-10 μ M) の前処置は、いずれの濃度においても 0.1 μ g/mL LPS 刺激による NO 産生量の増加に影響を与えなかった (Fig. 5B)。

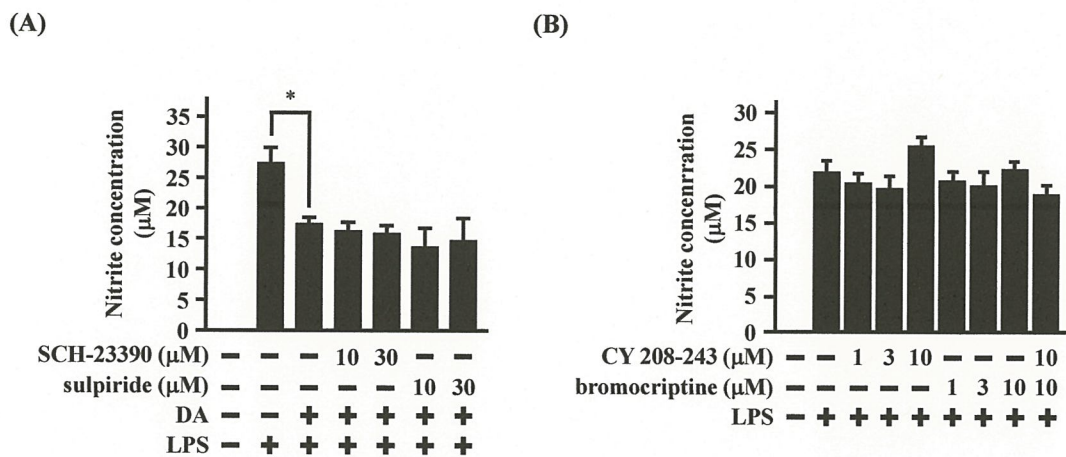


Figure. 5 DA receptor-independent inhibition by DA of LPS-induced NO production in BV-2 cells.

(A) Cells were treated for 24 h with 10 μ M DA in the absence or presence of SCH-23390 (10, 30 μ M) or sulpiride (10, 30 μ M). Then the cells were treated with 0.1 μ g/mL LPS for 24 h. The nitrite levels were determined by Griess assay. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. * P < 0.05 (B) Cells were treated with CY 208-243 and/or bromocriptine at the indicated concentrations for 24 h. Then the cells were treated with 0.1 μ g/mL LPS for 24 h. The nitrite levels were determined by Griess assay. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments.

次に、BV-2 細胞におけるドパミンによるサイトカイン及び iNOS mRNA 発現誘導抑制作用に対するドパミン受容体遮断薬の影響を検討した。SCH-23390 (30 μ M) 及び sulpiride (30 μ M) はいずれも、ドパミン (30 μ M) 前処置によるサイトカイン及び iNOS mRNA 発現誘導抑制作用に影響を与えなかった (Fig. 6A - D)。また、ドパミン受容体作用薬である CY208-243 (1-30 μ M) 及び bromocriptine (1-30 μ M) の前処置は、いずれの濃度においても 10 μ g/mL LPS 刺激によるサイトカイン及び iNOS mRNA の発現誘導に影響を与えなかった (Fig. 7A - D)。これらの結果から、ドパミンはドパミン受容体を介さずに NO 産生及びサイトカイン mRNA の発現誘導を抑制していることが示唆された。

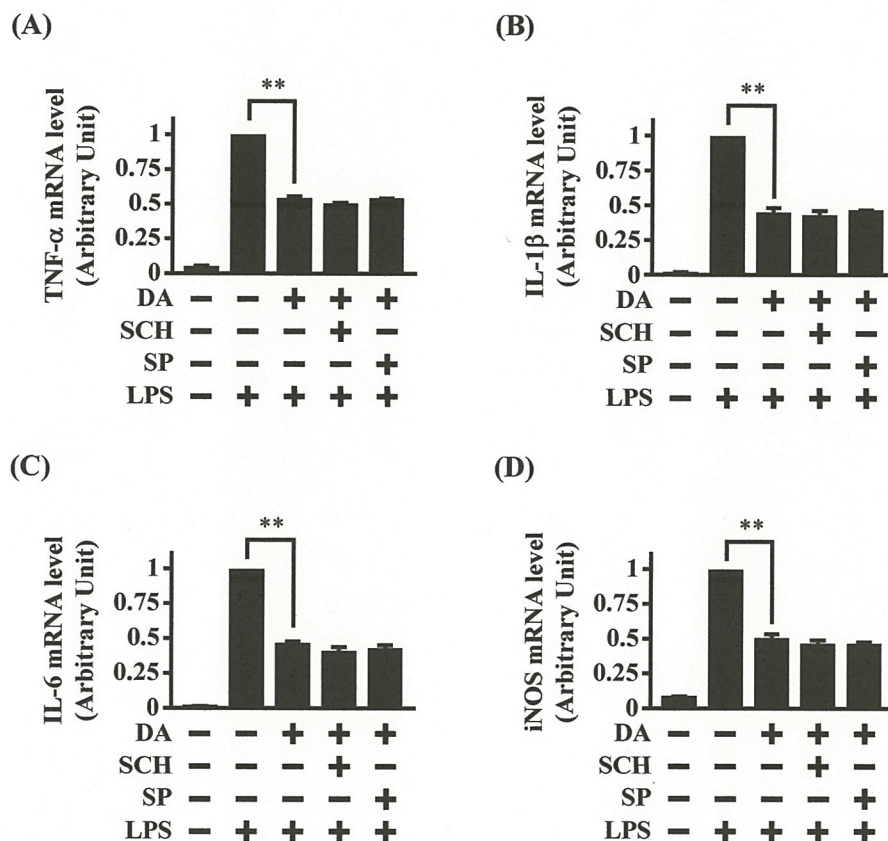


Figure. 6 Effects of DA receptor antagonists on the attenuation of LPS-induced mRNA expressions of cytokines and iNOS by pretreatment with DA in BV-2 cells.

Cells were treated for 24 h with 30 μ M DA in the absence or presence of 30 μ M SCH-23390 (SCH) or 30 μ M sulpiride (SP). Then the cells were treated with 10 μ g/mL LPS for 9 h. The mRNA levels of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) and iNOS (D) were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of cytokines and iNOS were normalized to β -actin and were expressed as relative to the maximum expression level, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 3 independent experiments. ** P < 0.01

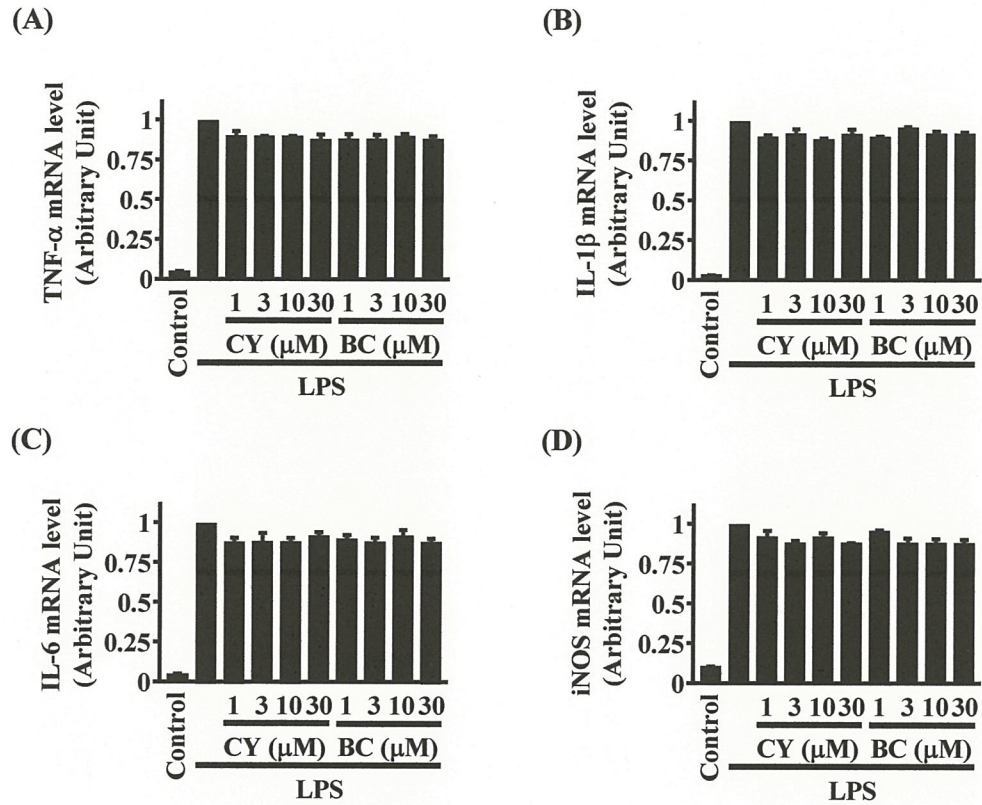


Figure. 7 Effects of DA receptor agonists on LPS-induced mRNA expressions of cytokines and iNOS in BV-2 cells.

Cells were treated with CY 208-243 (CY) or bromocriptine (BC) at the indicated concentrations for 24 h. Then the cells were treated with 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS for 9 h. The mRNA levels of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) and iNOS (D) were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of cytokines and iNOS were normalized to β -actin and were expressed as relative to the maximum expression level, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 3 independent experiments.

1.3 BV-2 細胞におけるドパミンによる NO 産生抑制作用及びサイトカイン発現誘導抑制作用への活性酸素種及びドパミンキノンの関与

ドパミンは、自動酸化されることによりスーパーオキシドアニオンとドパミンキノンを生成することが知られている⁵⁶⁾。そこで、BV-2 細胞におけるドパミンによる NO 及びサイトカイン産生抑制作用への活性酸素種及びドパミンキノンの関与を明らかにする目的で、抗酸化剤である NAC 及びアスコルビン酸の影響について検討した。

ドパミン (10 μ M) 前処置による LPS 誘発 NO 産生抑制作用は、10 mM NAC 及び 500 μ M アスコルビン酸の存在下で有意に阻害された (Fig. 8)。また、ドパミン (30 μ M) 前処置による LPS 誘発サイトカイン及び iNOS mRNA 発現誘導抑制作用も、10 mM NAC の存在下で有意に阻害された (Fig. 9A - D)。これらの結果から、ドパミンによる NO 産生抑制作用及びサイトカイン mRNA 発現誘導抑制作用への活性酸素種及びドパミンキノンの関与が示唆された。

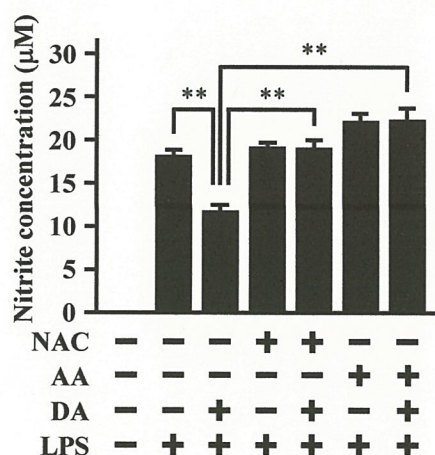


Figure. 8 Effects of NAC and ascorbic acid (AA) on the attenuation of LPS-induced NO production by DA in BV-2 cells.

Cells were treated for 24 h with 10 μ M DA in the absence or presence of 10 mM NAC or 500 μ M AA. Then the cells were treated with 0.1 μ g/mL LPS for 24 h. The nitrite levels were determined by Griess assay. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. ** P < 0.01

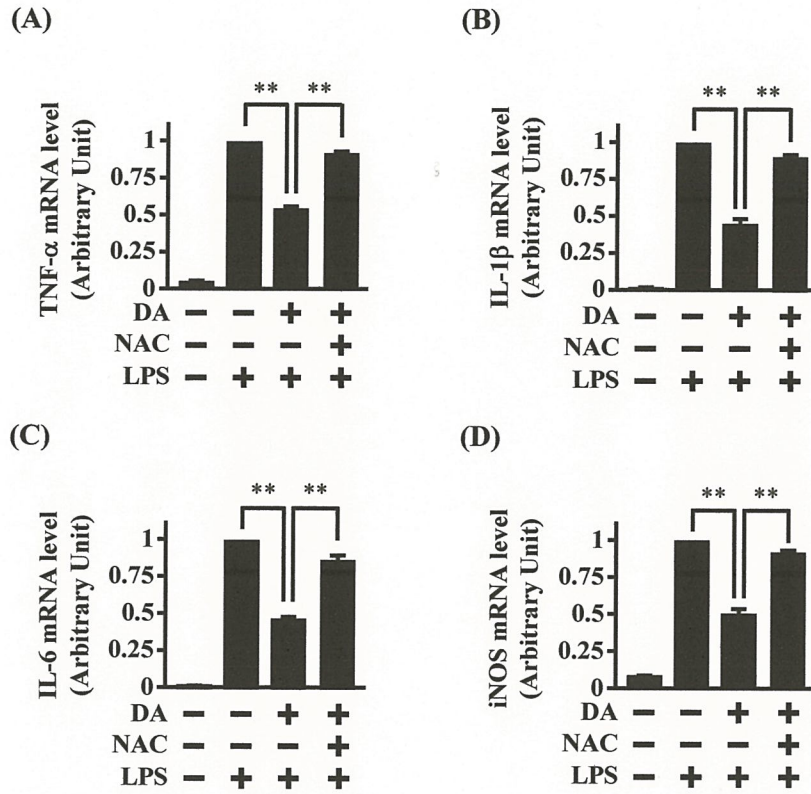


Figure. 9 Effect of NAC on the attenuation of LPS-induced mRNA expressions of cytokines and iNOS by DA in BV-2 cells.

Cells were treated for 24 h with 30 μ M DA in the absence or presence of 10 mM NAC. Then the cells were treated with 10 μ g/mL LPS for 9 h. The mRNA levels of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) and iNOS (D) were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of cytokines and iNOS were normalized to β -actin and were expressed as relative to the maximum expression level, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 3 independent experiments. ** $P < 0.01$

そこで次に、LPS 刺激による NO 産生及びサイトカイン mRNA 発現誘導に対する H_2O_2 及びスーパーオキシドアニオンの影響について検討した。 H_2O_2 (10-100 μM) の 24 時間前処置はいずれの濃度においても 0.1 $\mu g/mL$ LPS 刺激による NO 産生量の増加に影響を与えなかった (Fig. 10A)。また、スーパーオキシド産生系であるヒポキサンチン (HX, 50 μM) 及びキサンチンオキシダーゼ (XO, 1-30 $\mu U/mL$) の併用前処置も、LPS 刺激による NO 産生量の増加に影響を与えなかった (Fig. 10B)。さらに、 H_2O_2 (10-100 μM) 前処置及び HX (50 μM) 及び XO (1-10 $\mu U/mL$) の併用前処置はいずれも、10 $\mu g/mL$ LPS 刺激によるサイトカイン及び iNOS mRNA の発現誘導に影響を与えなかった (Fig. 11A - D)。

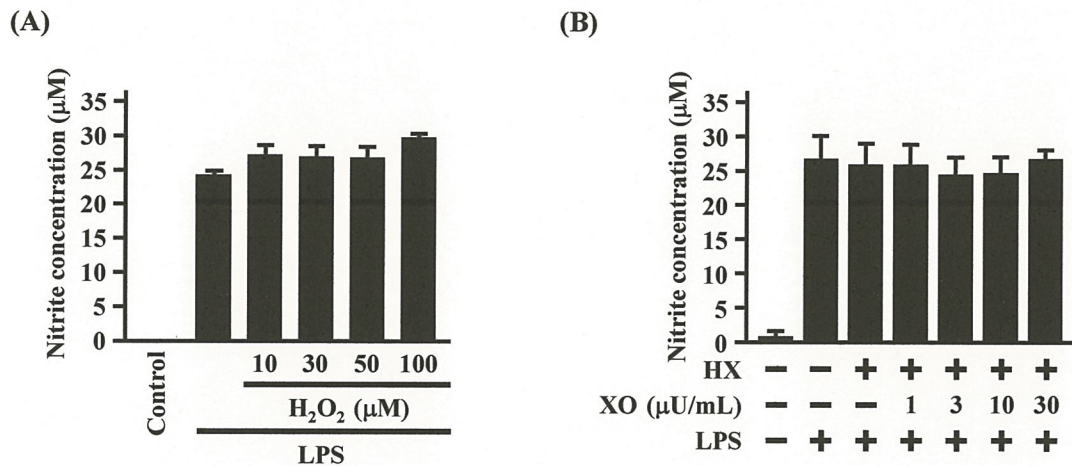


Figure. 10 Effects of pretreatment with H_2O_2 or HX/XO, a superoxide generating system, on LPS-induced NO production in BV-2 cells.

Cells were treated with H_2O_2 (A) or HX/XO (B) at the indicated concentrations for 24 h. Then the cells were treated with 0.1 $\mu g/mL$ LPS for 24 h. The nitrite levels were determined by Griess assay. Results show the mean \pm s.e. obtained from 3 independent experiments.

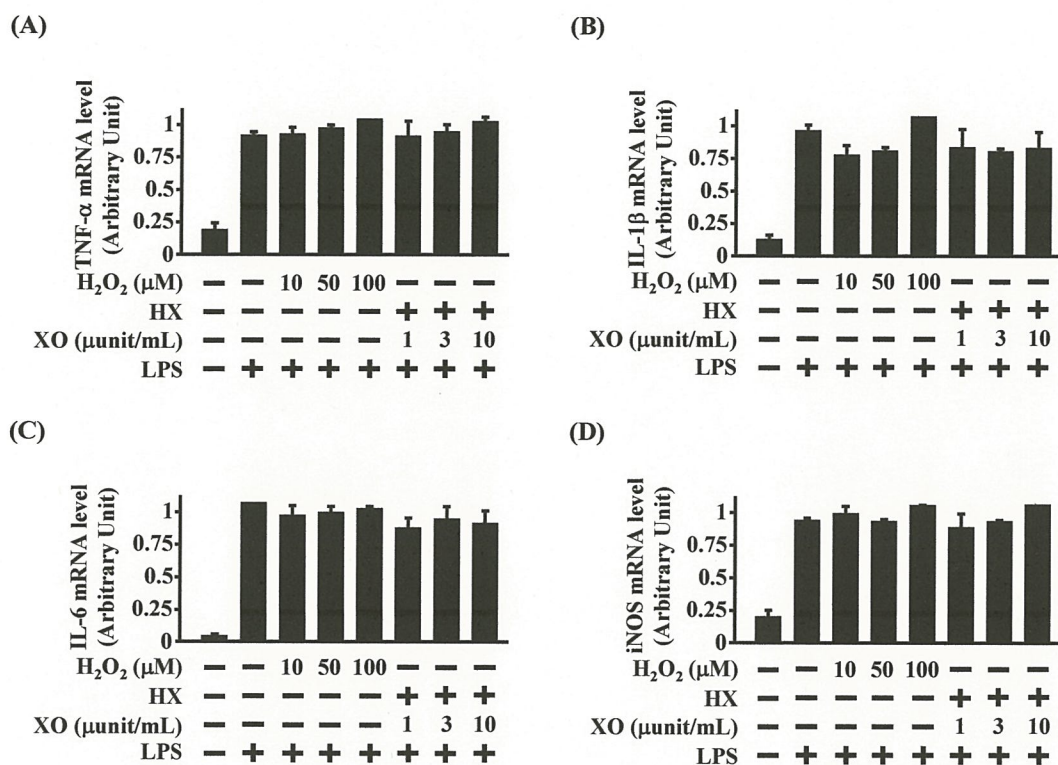


Figure. 11 Effects of pretreatment with H₂O₂ or HX/XO, on LPS-induced mRNA expressions of cytokines and iNOS in BV-2 cells.

Cells were treated with H₂O₂ or HX/XO at the indicated concentrations for 24 h. Then the cells were treated with 10 μ g/mL LPS for 9 h. The mRNA levels of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) and iNOS (D) were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of cytokines and iNOS were normalized to β -actin and were expressed as relative to the maximum expression level, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 3 independent experiments.

チロシナーゼは、ドパミンからドパミンキノンへの酸化を触媒する酵素として知られている⁵⁷⁾。次に、ドパミンによる NO 産生抑制作用及びサイトカイン発現誘導抑制作用へのドパミンキノンの関与を明らかにする目的で、チロシナーゼの影響について検討した。ドパミン (10 μ M) の 1 時間前処置は、0.1 μ g/mL LPS 刺激による NO 産生量の増加に影響を与えなかった。一方、300 U/mL チロシナーゼの存在下では、ドパミン (10 μ M) の 1 時間前処置は LPS 刺激による NO 産生量の増加を有意に抑制した (Fig. 12)。また、ドパミン (30 μ M) の 1 時間前処置は、10 μ g/mL LPS 刺激によるサイトカイン及び iNOS mRNA の発現誘導に影響を与えなかったが、チロシナーゼの存在下では、LPS 刺激によるサイトカイン及び iNOS mRNA の発現誘導を有意に抑制した (Fig. 13A - D)。

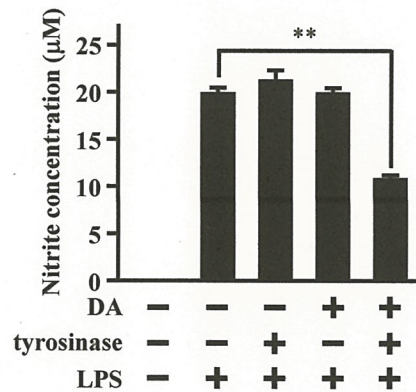


Figure. 12 Effects of DA and tyrosinase on LPS-induced NO production in BV-2 cells.

Cells were treated for 1 h with 10 μ M DA in the absence or presence of 300 U/mL tyrosinase in tyrosine-free DMEM without serum. Then the cells were treated with 0.1 μ g/mL LPS in FBS/DMEM for 24 h. The nitrite levels were determined by Griess assay. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. ** $P < 0.01$

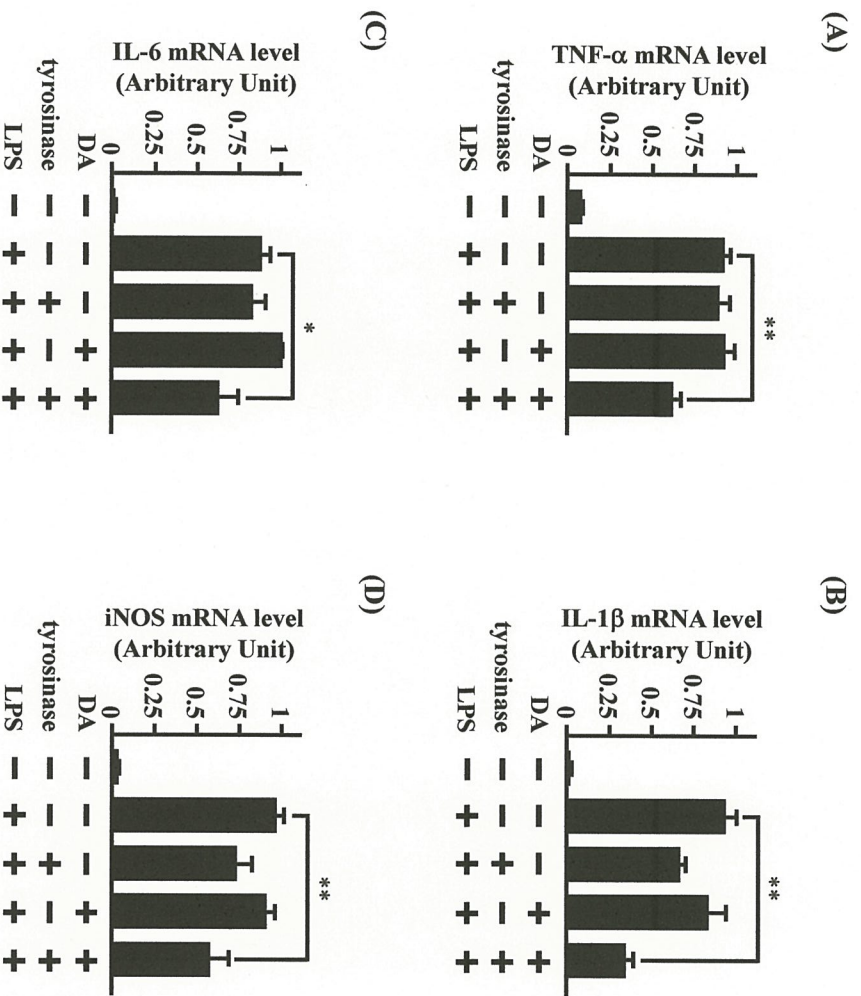


Figure. 13 Effects of DA and tyrosinase on LPS-induced mRNA expressions of cytokines and iNOS in BV-2 cells.

Cells were treated for 1 h with 30 μ M DA in the absence or presence of 300 U/mL tyrosinase in tyrosine-free DMEM without serum. Then the cells were treated with 10 μ g/mL LPS in FBS/DMEM for 9 h. The mRNA levels of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) and iNOS (D) were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of cytokines and iNOS were normalized to β -actin and was expressed as relative to the maximum expression level, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

次に、ドパミン処置後のキノプロテイン量について、NBT/glycinate assay により検討した。ドパミン (1-100 μ M) の 24 時間処置により、キノプロテイン量は濃度依存的に増加した (Fig. 14A)。また、10 mM NAC 及び 500 μ M アスコルビン酸はそれぞれ、10 μ M ドパミン処置によるキノプロテイン量の増加を有意に抑制した (Fig. 14B)。一方、10 μ M ドパミンの 1 時間処置は、キノプロテイン量に影響を与えなかったが、300 U/mL チロシナーゼの存在下では、キノプロテイン量を有意に増加させた (Fig. 14C)。これらの結果から、ドパミンはドパミンキノンの生成を介して蛋白質をキノプロテイン化することにより、NO 産生及びサイトカイン mRNA の発現誘導を抑制することが示唆された。

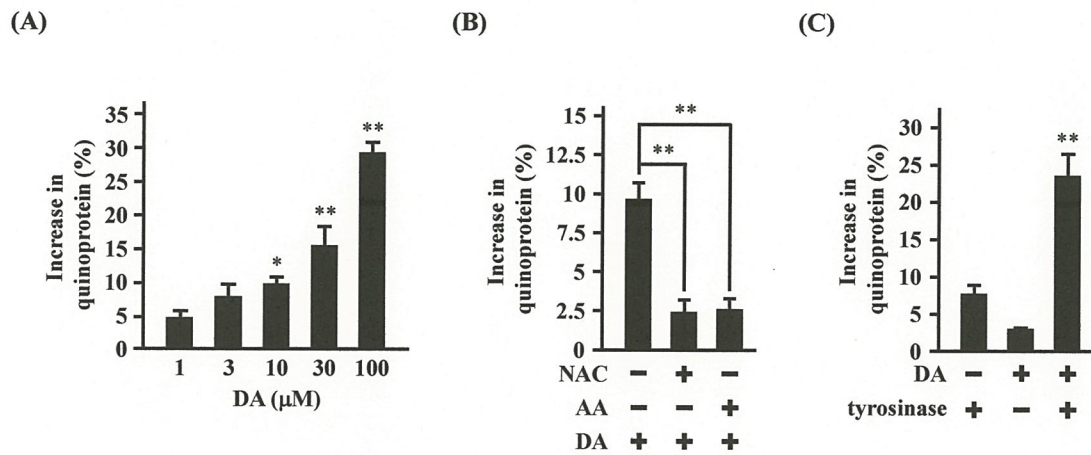


Figure. 14 Effects of NAC and AA on DA-induced increase in the level of quinoprotein in BV-2 cells. (A) Cells were treated for 24 h with DA at the indicated concentrations for 24 h. Then the quinoprotein level was determined by NBT/glycinate assay. The quinoprotein level was expressed as percentage increase over that in the untreated control. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01. vs. DA-untreated control. (B) Cells were treated for 24 h with 10 μ M DA in the absence or presence of 10 mM NAC or 500 μ M AA. Then the quinoprotein level was determined by NBT/glycinate assay. The quinoprotein level was expressed as percentage increase over that in the untreated control. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. ** P < 0.01. (C) Cells were treated for 1 h with 10 μ M DA in the absence or presence of 300 U/mL tyrosinase in tyrosine-free DMEM without serum. Then the quinoprotein level was determined by NBT/glycinate assay. The quinoprotein level was expressed as percentage increase over that in the untreated control. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. ** P < 0.01. vs. DA-untreated control.

1.4 BV-2 細胞における LPS 刺激による NF- κ B p65 の活性化に対するドパミンの影響

RAW264.7 細胞やマウスミクログリア株 N13 細胞、マウスミクログリア株 N9 細胞において、LPS は転写因子である NF- κ B を介して、iNOS、TNF- α 、IL-1 β 及び IL-6 を発現誘導することが報告されている^{43, 58, 59}。また、NF- κ B は通常、I κ B により細胞質に保持されており、I κ B が分解することで NF- κ B が核に移行し活性化することが知られている⁶⁰⁻⁶³。そこで、BV-2 細胞におけるドパミンによる NO 産生抑制作用及びサイトカイン発現誘導抑制作用の詳細な機構を明らかにする目的で、BV-2 細胞での LPS 刺激による NF- κ B の活性化に対するドパミンの影響について、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにより検討した。

LPS (10 μ g/mL) の 6 時間刺激により、NF- κ B の転写活性化に伴うルシフェラーゼ活性の有意な上昇がみられたが、この上昇は 30 μ M ドパミンの 24 時間前処置により有意に抑制された (Fig. 15)。この結果から、BV-2 細胞において、ドパミンは NF- κ B の転写活性化を抑制することにより NO 産生及びサイトカイン mRNA の発現誘導を抑制することが示唆された。

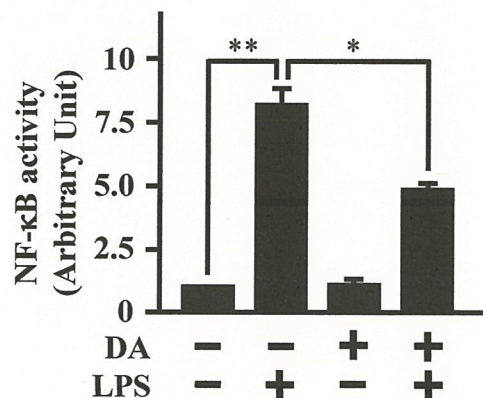


Figure. 15 Effect of pretreatment with DA on NF- κ B activity in BV-2 cells.

Cells were transfected with a NF- κ B-luciferase reporter construct. At 24 h post-transfection, cells were treated with 30 μ M DA for 24 h. Then the cells were treated with 10 μ g/mL LPS for 6 h. A luciferase reporter gene assay was performed as described in methods. Luciferase activity was presented as a fold induction relative to that of the control. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01

次に、LPS 刺激による NF- κ B の核移行に対するドパミンの影響を検討する目的で、細胞質画分、核画分及び whole cell lysate の各細胞画分における NF- κ B p65 量及び I κ B α 量を Western blotting により検討した。NF- κ B のサブユニットで転写活性化ドメインを有する NF- κ B p65 量は、LPS (10 μ g/mL) 刺激により核画分で経時的に増加したが、この増加は、30 μ M ドパミンの 24 時間前処置により抑制された (Fig. 16)。一方、LPS 刺激により、細胞質画分及び whole cell lysate においても NF- κ B p65 量は増加したが、これらの増加にドパミン前処置は影響を与えなかった。また、NF- κ B p65 サブユニットと結合し、その核移行を抑制する I κ B α 量は、whole cell lysate において、LPS 刺激 30 分後には著明に減少し、刺激 6 時間後には無処置と同程度にまで回復した。この I κ B α 量の減少と回復過程に、ドパミン前処置は影響を与えなかった。

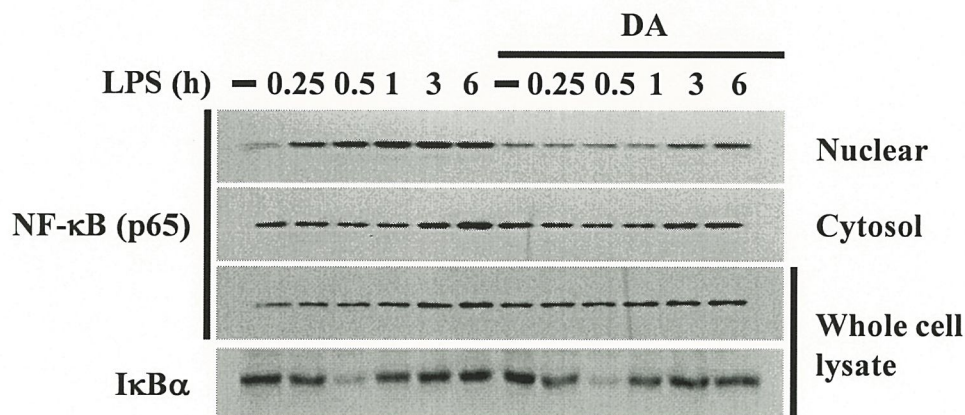


Figure. 16 Effect of pretreatment with DA on LPS-induced translocation of NF- κ B p65 subunit and degradation of I κ B α in BV-2 cells.

Cells were treated with 30 μ M DA for 24 h. Then the cells were treated with 10 μ g/mL LPS for the indicated times. The cells were harvested and subjected to subcellular fractionation. The fractions were analyzed by Western blotting with anti-NF- κ B p65 and anti-I κ B α antibodies. Results show blots representative of 3 independent experiments.

次に、NF- κ B p65 の細胞内局在について免疫染色法により検討した。無処置の細胞では、NF- κ B p65 陽性反応は、核にはほとんどみられず、細胞質に観察された (Fig. 17)。この NF- κ B p65 の細胞内局在に対して、ドパミン (30 μ M) の 24 時間処置は影響を与えなかった。一方、10 μ g/mL LPS の 1 時間刺激により、NF- κ B p65 陽性反応は細胞質だけでなく核にもみられるようになった。この変化は、ドパミン前処置により抑制された (Fig. 17)。これらの結果から、ドパミンは LPS 刺激による NF- κ B p65 の核移行を抑制することにより、NO 産生及びサイトカイン mRNA の発現誘導を抑制することが示唆された。

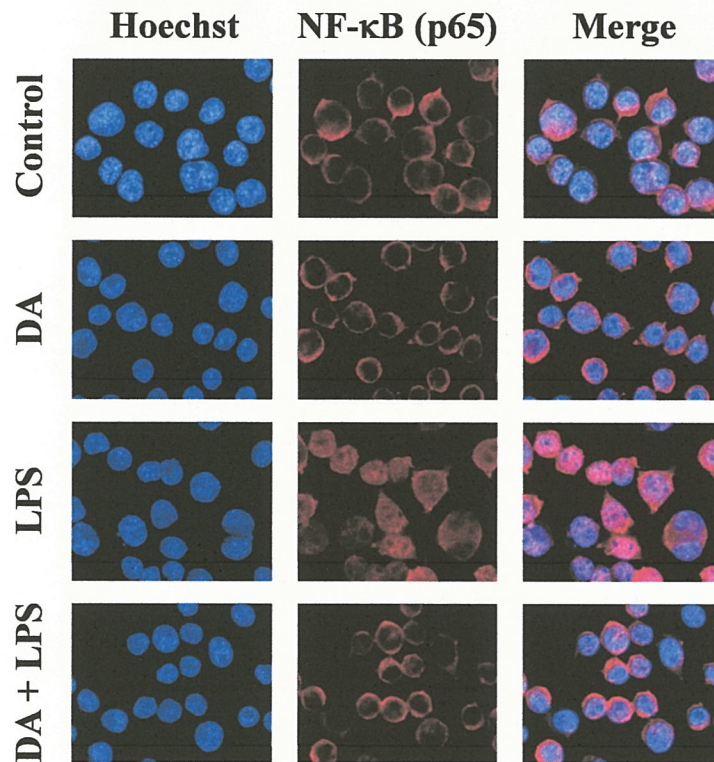


Figure. 17 Immunocytochemical analysis of NF- κ B p65 localization in BV-2 cells.

Cells were treated with 30 μ M DA for 24 h. Then the cells were treated with 10 μ g/mL LPS for 1 h. The cells were immunostained with anti-NF- κ B p65 antibody (red), and nuclei were visualized by staining with Hoechst 33342 (blue). Results show photomicrographs representative of 3 independent experiments.

1.5 BV-2 細胞におけるドパミンによる NF- κ B p65 の核移行抑制機構

BV-2 細胞におけるドパミンによる NF- κ B p65 の核移行抑制作用へのドパミンキノンの関与を明らかにする目的で、NAC の影響について検討した。LPS 刺激による核画分での NF- κ B p65 量の増加に対するドパミン (30 μ M) の抑制作用は、10 mM NAC の存在下で阻害された (Fig. 18)。この結果から、ドパミンは、ドパミンキノンの生成を介して蛋白質をキノプロテイン化することにより、NF- κ B p65 の核移行を抑制することが示唆された。

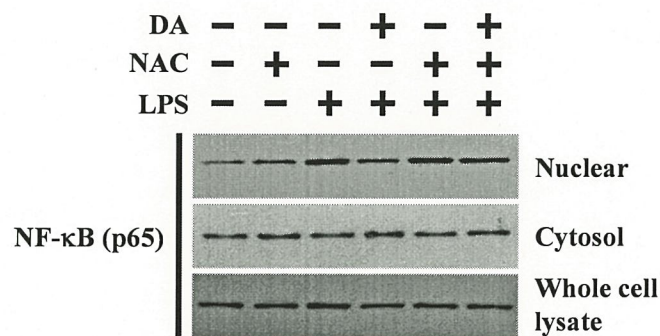


Figure. 18 Effect of NAC on DA-induced inhibition of NF- κ B p65 nuclear translocation in BV-2 cells.

Cells were treated for 24 h with 30 μ M DA in the absence or presence of NAC. Then the cells were treated with 10 μ g/mL LPS for 1 h. The cells were harvested and subjected to subcellular fractionation. The fractions were analyzed by Western blotting with anti-NF- κ B p65 antibody. Results show blots representative of 3 independent experiments.

ラット海馬由来初代培養神経細胞において、NF- κ B p65 は微小管に依存して核移行することが報告されている⁶⁴⁾。BV-2 細胞における NF- κ B p65 の核移行への微小管輸送系の関与を明らかにする目的で、微小管重合阻害薬ビンブラスチンの影響について、Western blotting により検討した。LPS (10 μ g/mL) 刺激による核画分での NF- κ B p65 量の経時的な増加は、0.3 μ M ビンブラスチンの存在下で抑制された (Fig. 19)。一方、LPS 刺激後の細胞質画分及び whole cell lysate での NF- κ B p65 量の増加にビンブラスチンは影響を与えなかった。さらに、whole cell lysate における LPS 刺激後の I κ B α 量の減少と回復過程に、ビンブラスチンは影響を与えなかった。また、0.3 μ M ビンブラスチンは、10 μ g/mL LPS 刺激によるサイトカイン及び iNOS mRNA の発現誘導を有意に抑制した (Fig. 20A - D)。

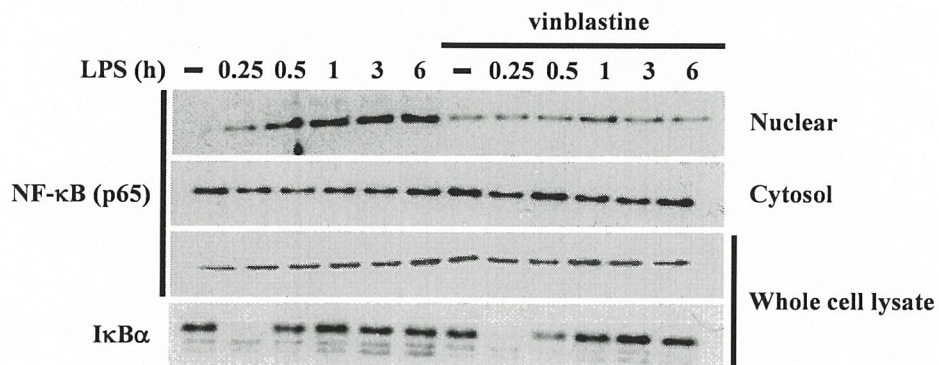
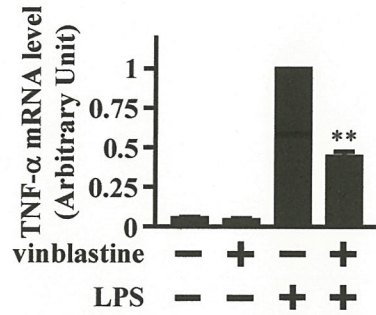


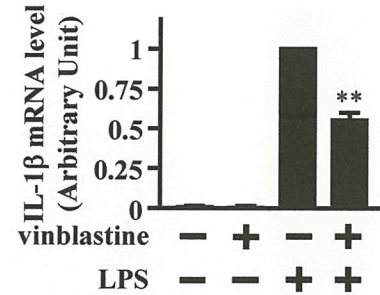
Figure. 19 Effect of vinblastine, a microtubule-disrupting agent, on LPS-induced translocation of NF- κ B p65 subunit and degradation of I κ B α in BV-2 cells.

Cells were treated for the indicated times with 10 μ g/mL LPS in the absence or presence of 0.3 μ M vinblastine. The cells were harvested and subjected to subcellular fractionation. The fractions were analyzed by Western blotting with anti-NF- κ B p65 and anti-I κ B α antibodies. Results show blots representative of 3 independent experiments.

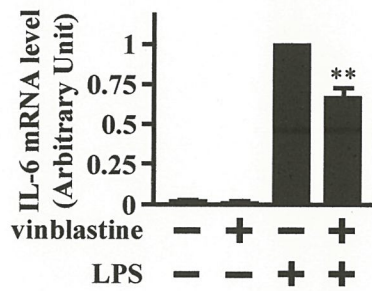
(A)



(B)



(C)



(D)

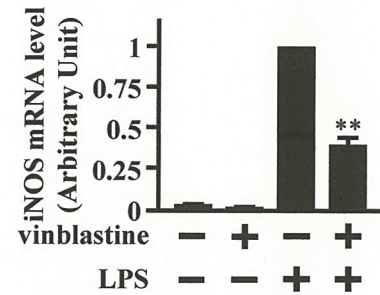


Figure. 20 Effect of vinblastine on LPS-induced mRNA expressions of cytokines and iNOS in BV-2 cells

Cells were treated for 9 h with 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS in the absence or presence of 0.3 μM vinblastine. The mRNA levels of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) and iNOS (D) were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of cytokines and iNOS were normalized to β -actin and were expressed as relative to the maximum expression level, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. ** $P < 0.01$ vs. 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS

次に、NF- κ B p65 の細胞内局在及び微小管に対するドパミン及びビンブラスチンの影響について免疫染色法により検討した。無処置の細胞では、微小管は細胞質に線維状の構造物として観察されたが、ビンブラスチン (0.3 μ M) を処置した細胞では、微小管の線維状構造が消失し、細胞の形態が変化していた (Fig. 21)。無処置細胞を LPS (10 μ g/mL) で 1 時間刺激すると、NF- κ B p65 陽性反応が細胞質だけでなく核にも観察された。一方、ビンブラスチンの存在下では、核に NF- κ B p65 の陽性反応は観察されなかった (Fig. 21)。これらの結果より、BV-2 細胞において NF- κ B は微小管を介して核移行することが示唆された。ドパミン (30 μ M) 前処置は、ビンブラスチンと同様に、LPS 刺激による NF- κ B p65 の細胞内局在の変化を抑制したが、微小管の形態に変化はみられなかった (Fig. 21)。これらの結果から、ドパミンは微小管を介した NF- κ B の核への輸送を阻害している可能性が考えられた。

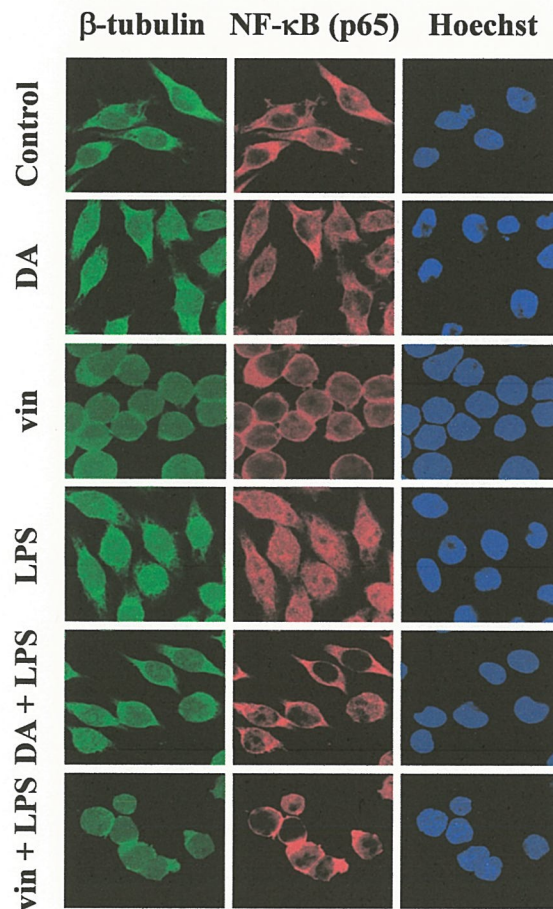
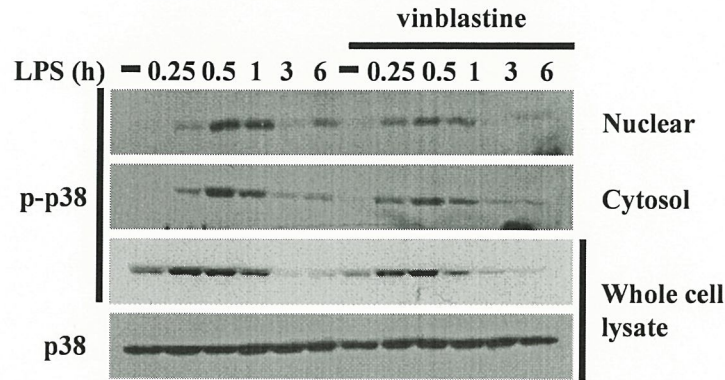


Figure. 21 Immunostaining of NF- κ B p65 and β -tubulin in BV-2 cells.

Cells were treated with 30 μ M DA for 24 h. Then the cells were treated for 1 h with 10 μ g/mL LPS in the absence or presence of 0.3 μ M vinblastine (vin). The cells were immunostained with anti-NF- κ B p65 antibody (red) and anti- β -tubulin antibody (green), and nuclei were visualized by staining with Hoechst 33342 (blue). Results show photomicrographs representative of 3 independent experiments.

次に、ドパミンによる他の蛋白質の核移行に対する影響について検討した。ミクログリアにおいて、LPS 刺激により mitogen-activated protein kinase (MAPK) の一種である p38 MAPK が、transforming growth factor (TGF)- β 1 刺激により転写因子である Smad2 が、それぞれリン酸化され核移行することが知られている^{65, 66)}。そこで、BV-2 細胞における p38 MAPK 及び Smad2 の核移行に対するビンブラスチン及びドパミンの影響について、Western blotting により検討した。LPS (10 μ g/mL) 刺激は、whole cell lysate における p38 MAPK 量に影響を与えなかったが、核画分、細胞質画分及び whole cell lysate でのリン酸化 p38 MAPK 量は、LPS 刺激 30 分後をピークとして増加し、刺激 3 時間後には無処置と同程度まで減少した。この各画分でのリン酸化 p38 MAPK 量の増加と減少過程に、30 μ M ドパミン及び 0.3 μ M ビンブラスチンは影響を与えなかった (Fig. 22A, B)。これらの結果より、BV-2 細胞において、LPS 刺激によるリン酸化 p38 MAPK の核移行には微小管輸送系は関与しないこと、またその核移行にドパミンは影響を与えないことが示唆された。一方、TGF- β 1 (1 ng/mL) 刺激は、whole cell lysate における Smad2 量に影響を与えなかったが、核画分、細胞質画分及び whole cell lysate でのリン酸化 Smad2 量は、TGF- β 1 刺激により経時的に増加した。この核画分でのリン酸化 Smad2 量の増加は、0.3 μ M ビンブラスチンにより抑制されたが、細胞質画分及び whole cell lysate でのリン酸化 Smad2 量の増加にビンブラスチンは影響を与えなかった (Fig. 23A)。また、30 μ M ドパミン前処置もビンブラスチンと同様に、核画分での TGF- β 1 刺激によるリン酸化 Smad2 量の増加を抑制したが、細胞質画分及び whole cell lysate での TGF- β 1 刺激によるリン酸化 Smad2 量の増加には影響を与えなかった (Fig. 23B)。これらの結果より、TGF- β 1 刺激によるリン酸化 Smad2 の核移行には微小管輸送系が関与すること、ドパミンはその核移行を抑制することが示唆された。以上の結果から、ドパミンは微小管輸送系を阻害することにより NF- κ B の核移行を抑制することが強く示唆された。

(A)



(B)

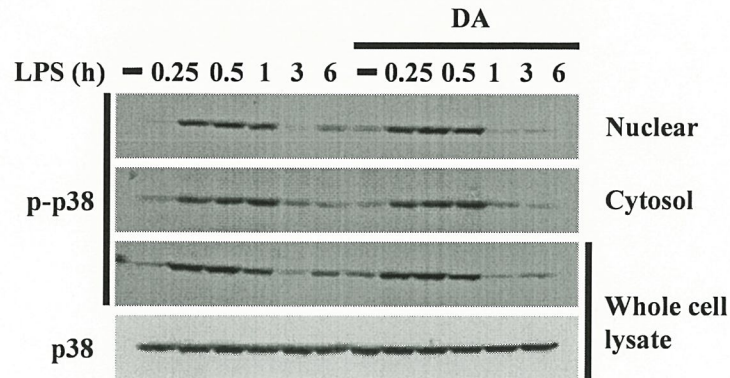
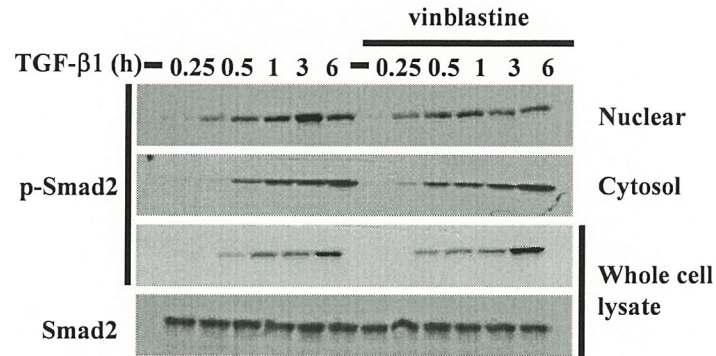


Figure. 22 Effects of vinblastine and DA on LPS-induced nuclear translocation of p-p38 in BV-2 cells.

(A) Cells were treated for the indicated times with 10 μ g/mL LPS in the absence or presence of 0.3 μ M vinblastine. The cells were harvested and subjected to subcellular fractionation. The fractions were analyzed by Western blotting with anti-p38 and anti-phosphorylated p38 antibodies. Results show blots representative of 3 independent experiments.

(B) Cells were treated with 30 μ M DA for 24 h. The cells were harvested and subjected to subcellular fractionation. The fractions were analyzed by Western blotting with anti-p38 and anti-phosphorylated p38 antibodies. Results show blots representative of 3 independent experiments.

(A)



(B)

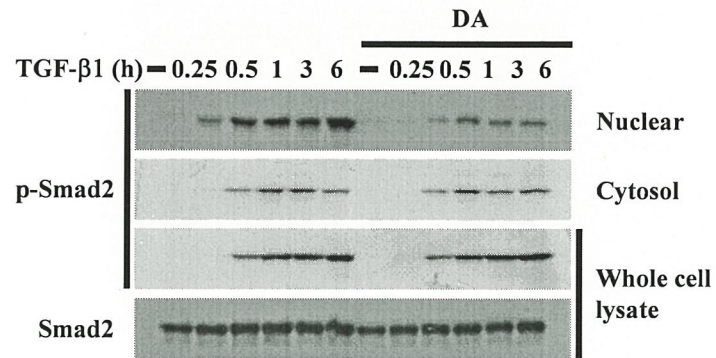


Figure. 23 Effects of vinblastine and DA on TGF- β 1-induced nuclear translocation of p-Smad2 in BV-2 cells.

(A) Cells were treated for the indicated times with 1 ng/mL TGF- β 1 in the absence or presence of 0.3 μ M vinblastine. The cells were harvested and subjected to subcellular fractionation. The fractions were analyzed by Western blotting with anti-Smad2 and anti-phosphorylated Smad2 antibodies. Results show blots representative of 3 independent experiments.

(B) Cells were treated with 30 μ M DA for 24 h. The cells were harvested and subjected to subcellular fractionation. The fractions were analyzed by Western blotting with anti-Smad2 and anti-phosphorylated Smad2 antibodies. Results show blots representative of 3 independent experiments.

1.6 マウス初代培養ミクログリアにおける LPS 刺激による NO 産生及びサイトカイン発現誘導に対するドパミンの影響

ドパミンによる NO 産生抑制作用がマウス初代培養ミクログリアでも同様にみられるか否かを明らかにする目的で、LPS 刺激による NO 産生に対するドパミンの影響について、Griess 法により検討した。BV-2 細胞と同様に、0.1 $\mu\text{g/mL}$ LPS の 24 時間刺激による NO 産生量の増加は、ドパミン (1-100 μM) の 24 時間前処置により濃度依存的に抑制された (Fig. 24A)。次に、マウス初代培養ミクログリアにおけるドパミンの NO 産生抑制作用へのドパミン受容体の関与について検討した。D₁ 様受容体遮断薬 SCH-23390 (10 μM) は、ドパミン (10 μM) 前処置による NO 産生抑制作用に影響を与えなかったが、D₂ 様受容体遮断薬 sulpiride (10 μM) はドパミンの NO 産生抑制作用を有意に阻害した (Fig. 24B)。また、D₁ 様受容体作用薬 CY208-243 (10 μM) の 24 時間前処置は、LPS 刺激による NO 産生量の増加に影響を与えなかったが、D₂ 様受容体作用薬 bromocriptine (10 μM) の 24 時間前処置は LPS 刺激による NO 産生量の増加を有意に抑制した (Fig. 24C)。さらに、ドパミンによる NO 産生抑制作用は、10 mM NAC の存在下で有意に阻害された (Fig. 24D)。以上の結果から、マウス初代培養ミクログリアにおけるドパミンの NO 産生抑制作用には、D₂ 様受容体を介した作用及びドパミンキノンを経した作用の 2 つの作用が存在することが示唆された。

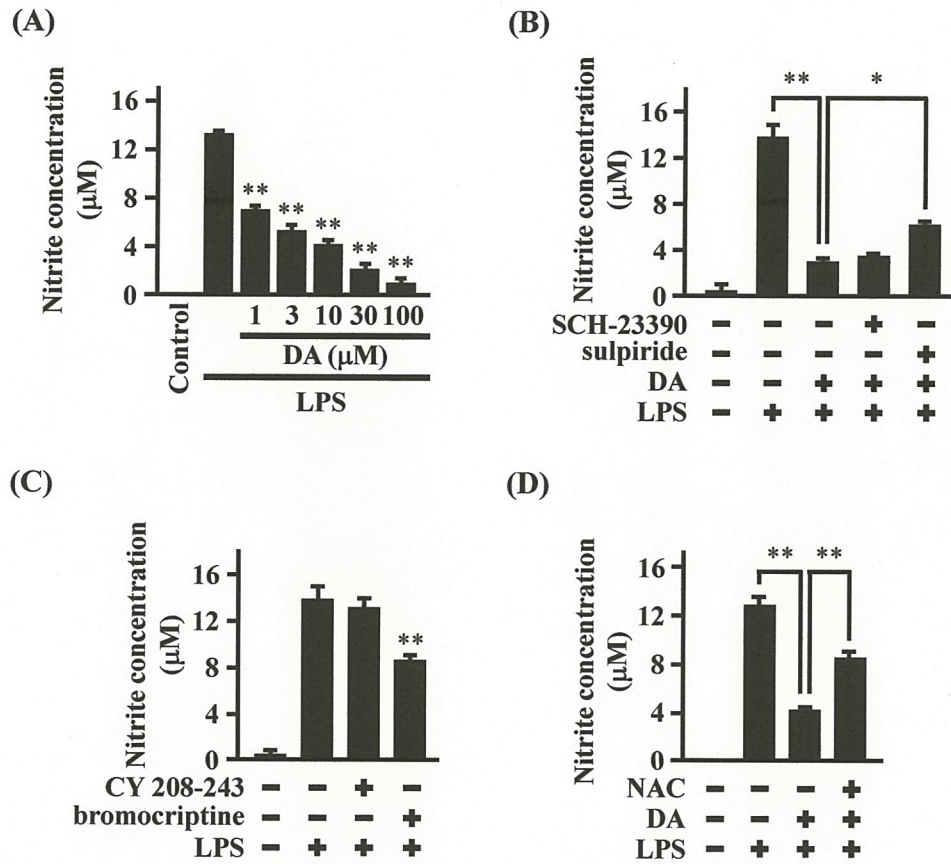


Figure. 24 DA attenuates LPS-induced NO production in primary microglia cells.

(A) Cells were treated with DA at the indicated concentrations for 24 h. Then the cells were treated with 0.1 μg/mL LPS for 24 h. The nitrite levels were determined by Griess assay. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. ** P < 0.01, vs. 0.1 μg/mL LPS. (B) Cells were treated for 24 h with 10 μM DA in the absence or presence of 10 μM SCH-23390 or 10 μM sulpiride. Then the cells were treated with 0.1 μg/mL LPS for 24 h. The nitrite levels were determined by Griess assay. Results show the mean \pm s.e. obtained from 3 independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01. (C) Cells were treated with 10 μM CY 208-243 or 10 μM bromocriptine for 24 h. Then the cells were treated with 0.1 μg/mL LPS for 24 h. The nitrite levels were determined by Griess assay. Results show the mean \pm s.e. obtained from 3 independent experiments. ** P < 0.01, vs. 0.1 μg/mL LPS. (D) Cells were treated for 24 h with 10 μM DA in the absence or presence of 10 mM NAC. Then the cells were treated with 0.1 μg/mL LPS for 24 h. The nitrite levels were determined by Griess assay. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. ** P < 0.01.

次に、マウス初代培養ミクログリアにおいて、ドパミンがサイトカイン発現誘導抑制作用を示すか否かを明らかにする目的で、LPS 刺激によるサイトカイン及び iNOS mRNA の発現誘導に対するドパミンの影響について、real-time RT-PCR 法により検討した。BV-2 細胞と同様に、1 ng/mL LPS の 9 時間刺激によるサイトカイン及び iNOS mRNA の発現誘導は、ドパミン (1-100 μ M) の 24 時間前処置により濃度依存的に抑制された (Fig. 25A - D)。次に、マウス初代培養ミクログリアにおける NF- κ B の核移行に対するドパミンの影響を検討する目的で、細胞質画分、核画分及び whole cell lysate の各細胞画分における NF- κ B p65 量及び I κ B α 量を Western blotting により検討した。LPS (1 ng/mL) の 1 時間刺激は、細胞質画分及び whole cell lysate での NF- κ B p65 量に影響を与えなかったが、核画分での NF- κ B p65 量を増加させた。この核画分での NF- κ B p65 量の増加は、10 μ M ドパミンの 24 時間前処置により抑制された。一方、ドパミン前処置は LPS 刺激後の whole cell lysate における I κ B α 量の減少に影響を与えなかった (Fig. 26)。これらの結果から、マウス初代培養ミクログリアにおいてもドパミンは、NF- κ B p65 の核移行を抑制することにより、NO 産生やサイトカイン mRNA の発現誘導を抑制していることが示唆された。

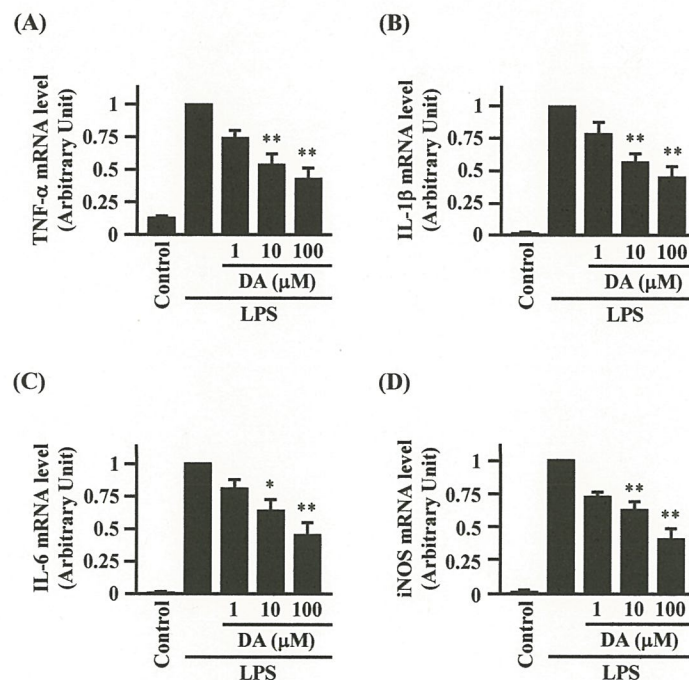


Figure. 25 Effect of pretreatment with DA on LPS-induced mRNA expressions of cytokines and iNOS in primary microglia cells

Cells were treated with DA at the indicated concentrations for 24 h. Then the cells were treated with 1 ng/mL LPS for 9 h. The mRNA levels of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) and iNOS (D) were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of cytokines and iNOS were normalized to β -actin and were expressed as relative to the maximum expression level, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. 1 ng/mL LPS

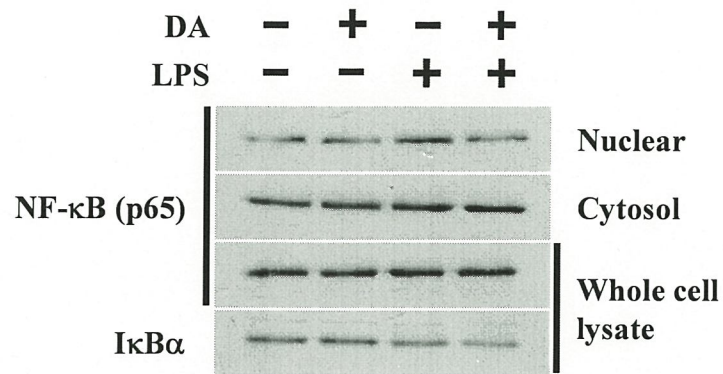


Figure. 26 Effect of pretreatment with DA on LPS-induced translocation of NF- κ B p65 subunit and degradation of I κ B α in primary microglia cells.

Cells were treated with 10 μ M DA for 24 h. Then the cells were treated with 1 ng/mL LPS for 1 h. The cells were harvested and subjected to subcellular fractionation. The fractions were analyzed by Western blotting with anti-NF- κ B p65 and anti-I κ B α antibodies. Results show blots representative of 3 independent experiments.

考察

ドパミンは、 $D_1 \sim D_5$ 受容体に作用することにより、その生理作用を示すことが知られている^{67,68)}。本研究において、BV-2 細胞には D_1 様受容体の一つである D_5 受容体及び D_2 様受容体の一つである D_2 受容体の mRNA の発現がみられたが (Fig. 4)、BV-2 細胞におけるドパミン前処置による NO 産生抑制作用やサイトカイン mRNA 発現誘導抑制作用は、 D_1 様受容体遮断薬 SCH-23390 及び D_2 様受容体遮断薬 sulpiride により阻害されなかった (Fig. 5A, 6)。また、 D_1 様受容体作用薬 CY-208-243 及び D_2 様受容体作用薬 bromocriptine 前処置は、LPS 刺激による NO 産生やサイトカイン mRNA の発現誘導に影響を与えなかった (Fig. 5B, 7)。これらの結果は、BV-2 細胞において、ドパミンが、ドパミン受容体を介さずに LPS 刺激による NO や炎症性サイトカイン産生を抑制していることを示唆している。一方、マウス及びラット初代培養ミクログリアにおいて、ドパミンが D_1 及び D_2 受容体を介して、LPS 誘発 NO 産生を抑制することが報告されている⁶⁹⁾。本研究において、マウス初代培養ミクログリアには D_1 様受容体の一つである D_1 受容体及び D_2 様受容体の一つである D_2 受容体の mRNA の発現がみられ (Fig. 4)、マウス初代培養ミクログリアにおける LPS 刺激による NO 産生は bromocriptine 前処置により抑制された (Fig. 24C)。また、ドパミンによる NO 産生抑制作用は sulpiride により阻害された (Fig. 24B)。これらの結果は、マウス初代培養ミクログリアにおいて、ドパミンが D_2 受容体を介して LPS 刺激による NO 産生を抑制していることを示唆している。本研究における BV-2 細胞での結果とマウス初代培養ミクログリアでの結果の相違、及び過去の報告との相違は、ドパミン受容体刺激後の細胞内シグナル伝達系の強度や経路が、用いた細胞により異なっていることに起因しているのかもしれない。この相違については今後の検討課題ではあるが、ミクログリアにおけるドパミンの NO 産生抑制作用には、ドパミン受容体を介した機構及びドパミン受容体を介さない機構の 2 つの機構が存在することが明らかになった。

ドパミンは、自動酸化によりスーパーオキシドアニオンや H_2O_2 などの活性酸素やドパミンキノンを生産することが知られている^{70,71)}。ラットのメサングウム細胞において、 H_2O_2 は IL-1 誘発 NO 産生を抑制すること⁷²⁾、ラットの C6 神経膠腫細胞において、L-dopa の自動酸化により産生されたスーパーオキシドアニオンは、LPS/TNF- γ 誘発 NO 産生を抑制することが報告されている⁷³⁾。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞株 HUVECs 細胞において、ディーゼルエンジンの排気に含まれる微粒子成分である Diesel exhaust particles 処置によって誘導される活性酸素が TNF- α 及び IL-6 を発現誘導することが報告されている⁷⁴⁾。本研究では、 H_2O_2 及びスーパーオキシドアニオンは、BV-2 細胞での LPS 刺激による NO 産生及びサイトカイン mRNA 発現誘導に影響を与えなかった (Fig. 10, 11)。これらの結果の相違は、細胞種の違いによるものかもしれないが、詳細については不明である。

ドパミンキンは、蛋白質のシステイン残基と結合することによりキノプロテイン化す

ることが知られており、トリプトファンヒドロキシラーゼやドパミントランスポーターを阻害することが報告されている^{52, 54)}。NAC は、ヒドロキシラジカルなどのフリーラジカルを消去すると共に、ドパミンキノンに結合し、蛋白質のキノプロテイン化を抑制することが知られている^{75, 76)}。また、NAC は、ドパミンの自動酸化を抑制することが報告されている⁷⁷⁾。本研究において、BV-2 細胞でのドパミンによる NO 産生抑制作用及びサイトカイン mRNA 発現誘導抑制作用は、NAC により阻害された (Fig. 8, 9)。また、マウス初代培養ミクログリアにおいても、NAC はドパミンによる NO 産生抑制作用を阻害した (Fig. 24D)。さらに、BV-2 細胞において、ドパミン処置によるキノプロテイン量の増加は (Fig. 14A)、NAC により阻害された (Fig. 14B)。これらの結果より、ドパミンはドパミンキノンの生成を介して、細胞内の蛋白質をキノプロテイン化することにより、NO 産生や炎症性サイトカイン産生を抑制していることが示唆された。このことは、BV-2 細胞において、LPS 刺激による NO 産生やサイトカイン mRNA の発現誘導がドパミンとチロシナーゼを共存させることにより抑制されること (Fig. 12, 13)、キノプロテイン量がドパミンとチロシナーゼを共存させることにより増加することからも支持される (Fig. 14C)。

炎症性サイトカインや iNOS の発現誘導には、NF- κ B が重要な転写因子であることが知られている⁷⁸⁻⁸⁰⁾。また、BV-2 細胞やマウスミクログリア株 N9 細胞において、LPS は、NF- κ B を介して TNF- α 、IL-1 β 及び IL-6 や iNOS を発現誘導することが報告されている^{43, 58, 81)}。本研究では、BV-2 細胞において、LPS 刺激により NF- κ B の転写活性が上昇し、この上昇はドパミン前処置により抑制された (Fig. 15)。また、BV-2 細胞及びマウス初代培養ミクログリアにおいて、LPS 刺激による核画分での NF- κ B p65 量の増加は、ドパミン前処置により抑制された (Fig. 16, 26)。これらの結果は、ミクログリアにおいて、ドパミンが NF- κ B を介して NO 産生や炎症性サイトカイン産生を抑制していることを示唆している。このことは、BV-2 細胞での免疫染色の検討において、LPS 刺激後の NF- κ B p65 の核への移行がドパミン前処置により抑制されたことから支持される (Fig. 17)。一方、BV-2 細胞やマウス初代培養ミクログリアにおいて、LPS 刺激による I κ B α 量の減少にドパミン前処置は影響を与えなかった (Fig. 16, 26)。これらの結果より、ミクログリアにおいてドパミンは、NF- κ B の核移行を抑制することにより、NO 産生や炎症性サイトカイン産生を抑制していることが示唆された。また、NF- κ B p65 と β -tubulin の免疫染色による検討により、ビンブラスチンは微小管構造を変化させ、NF- κ B p65 の核移行を抑制したが (Fig. 19, 21)、ドパミンは微小管の構造に影響することなく、NF- κ B p65 の核移行を抑制することが示された (Fig. 21)。これらの結果から、ドパミンは微小管を介した NF- κ B の核への輸送を阻害していることが示唆された。このことは、ドパミンが LPS 刺激による微小管を介さない p38 MAPK の核移行には影響を与えなかったが、TGF- β 1 刺激による微小管を介した Smad2 の核移行を抑制したことからも支持される (Fig. 22, 23)。SH-SY5Y 細胞において、 β -tubulin は、ドパミンキノンによりキノプロテイン化されることが報告されている⁸²⁾。本研究において、BV-2 細胞でのドパミンによる NF- κ B p65 の核移行抑制作用は、NAC により阻害された

(Fig. 18)。これらのことから、BV-2 細胞において、ドパミンはドパミンキノンの生成を介して微小管構成蛋白質をキノプロテイン化することにより、NF- κ B の微小管を介した核への輸送を抑制している可能性が考えられた。

種々の神経変性疾患において、炎症性サイトカインの病態進行への関与が示唆されている⁸³⁻⁸⁵⁾。第二章では、*in vitro* でみられたドパミンの炎症性サイトカイン産生抑制作用が、*in vivo* においても同様にみられるか否かを明らかにすることを目的に検討を行った。

第 2 章 脳内の炎症性サイトカイン産生に対するドパミンの影響

ドパミン神経細胞の神経核は主に黒質緻密部、腹側被蓋野、赤核後核に存在し⁸⁶⁾、線条体や大脳皮質などに投射している⁸⁷⁾。また、間脳から脊髄に投射する下行性のドパミン神経細胞も存在する⁸⁸⁾。種々の神経変性疾患患者の脳内において、ドパミン神経細胞の脱落によりドパミン量が減少していること⁸⁹⁻⁹⁴⁾、炎症性サイトカインが増加していることが報告されている^{15, 17, 18, 20, 95)}。また、第一章において、*in vitro* の実験系でドパミンがミクログリアによる炎症性サイトカイン産生を抑制することを示した。これらのことから、ドパミンが脳内においてミクログリアからの炎症性サイトカイン産生を抑制し、脳内の炎症制御に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) は、選択的なドパミン神経毒であり^{96, 97)}、脳内のアストロサイトに取り込まれ、monoamine oxidase-B (MAO-B) により酸化されて MPP⁺ となる。MPP⁺ は、アストロサイトから放出され、ドパミントランスポーターを介してドパミン神経細胞に選択的に取り込まれ、ミトコンドリアの電子伝達系の複合体 I を阻害し、ATP 合成を障害することにより細胞死を引き起こす^{91, 98)}。マウスやラットにおいて、MPTP の投与により黒質のドパミン神経細胞に細胞死が誘導され、線条体でのドパミン量が減少し、パーキンソン様症状が誘発されることが報告されている^{99, 100)}。

L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) は、ドパミンの前駆体であり、パーキンソン病治療薬として知られている^{101, 102)}。末梢投与された L-dopa は、中性アミノ酸トランスポーターを介して脳内に取り込まれ、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) によりドパミンへと変換される¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾。また、L-dopa は、AADC 阻害薬 carbidopa との併用により脳への移行が上昇し、線条体のドパミン量が著明に増加することが報告されている¹⁰⁶⁾。

本章では、MPTP を用いて脳内ドパミン量を減少させた時及び L-dopa を carbidopa と共に投与することにより脳内ドパミン量を増加させた時の C57BL/6 マウス脳内の炎症性サイトカインの産生を検討することで、脳内での炎症性サイトカインの産生におけるドパミンの役割について検討した。

実験方法

1) 薬物

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) は Sigma より購入した。L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) 及び carbidopa は LKT Laboratories, Inc (St, Paul, MN, USA) より購入した。抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体は、Santa Cruz Biotechnology より購入した。その他の試薬は Wako Pure Chemicals より購入した。

2) 動物及び薬物投与

実験に供した 8-10 週齢の C57BL/6 マウスは透明ケージで飼育し、室温: $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、照明時間: 1 日 12 時間の条件下で、餌と水を自由に摂取させた。動物実験の飼育、実験等はすべて日本薬理学会の動物実験に関する指針に基づき、摂南大学の動物実験に関する規定に従い実施した。ドパミン神経障害の誘導は、マウス腹腔内に MPTP (25 mg/kg) を 2 時間毎に 4 回投与することにより行った。L-dopa (50 mg/kg) は、carbidopa (5 mg/kg) と共にマウス腹腔内に 1 日 1 回、合計 3 回投与した。中枢神経系の炎症は、LPS (5 mg/kg) を腹腔内に投与及び 5- μL マイクロシリンジを用いて 2 μL の LPS (12.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) を線条体内 [bregma から前方へ 0.6 mm、正中より右側へ 1.8 mm、深さ 3.5 mm の位置]¹⁰⁷⁾ に投与することにより誘導した。また、対照として腹腔内及び線条体内に saline を投与した。

3) 運動機能の評価

マウスの運動機能は、ローターロッド試験により評価した。マウスを 16 rpm で回転するローターロッドトレッドミル上に乗せ、10 分間 \times 3 回の歩行訓練を 2 日行った後、24 rpm で回転するローターロッドトレッドミル上にマウスを乗せてから落下するまでの時間を測定した。測定は 600 秒間行い、落下しなかったマウスの装置上滞在時間を 600 秒とした。10 分間隔で 3 回試験を行い、その平均値を装置上滞在時間とした。

4) RNA の調製

薬物投与後、マウスを抱水クロラル麻酔下にて、右心房を切開し、左心室から体重量と同量 (1 mL/g) の PBS (-) を灌流することにより脱血した後、線条体、海馬、大脳皮質及び中脳を摘出した。組織重量の 10 倍量の SV RNA Lysis Buffer (Promega) を加え、ホモジナイザー (AS ONE, Osaka, Japan) を用いて組織をホモジナイズした後、第一章の方法に準じて RNA を調製した。

5) Real-time RT-PCR

第一章に示した方法及び下記の方法で real-time RT-PCR を行った。プライマーは、第一章に示したものと下記に示したものを用いた。

PCR 条件

- TH、dopamine transporter (DAT)

(95°C 10 秒、53°C 20 秒、72°C 20 秒を 40 サイクル)

プライマーデザイン

Gene	Sequence
TH forward	5'-GTT GGC TGA CCG CAC ATT T-3'
TH reverse	5'-AGC CCC CAG AGA TGC AA-3'
DAT forward	5'-CCA GCA ATT CAG TGA TGA CAT CA-3'
DAT reverse	5'-CAG CAT AGC CGC CAG TAC AG-3'

6) NBT/glycinate assay

薬物投与後、マウスを抱水クロラル麻酔下にて、右心房を切開し、左心室から体重量と同量 (1 mL/g) の PBS (-) を灌流することにより脱血した後、線条体を摘出し、組織重量の 10 倍量の lysis buffer (137 mM NaCl、8.1 mM Na₂HPO₄·12H₂O、2.68 mM KCl、1.47 mM KH₂PO₄、1% NP-40) を加え、ホモジナイザーを用いて組織をホモジナイズした。氷上で 20 分間静置した後、4°C、17,400 × g で 5 分間遠心し、上清を試料とした。試料を蛋白質定量した後、100 µg の蛋白質を含む試料 200 µL を、1 mL の NBT/glycinate 溶液 (0.24 mM NBT、2 M potassium glycinate、pH 10.0) と混合し、暗室で穏やかに振盪しながら 2 時間インキュベートした。20°C、17,400 × g で 5 分間遠心することにより、生成した NBT ホルマザンを沈降し、沈査を 2 N HCl で洗浄した後、300 µL の DMSO で可溶化し、吸光度 (λ = 530 nm) を測定することにより、キノプロテイン量を測定した。

7) 細胞分画

薬物投与後、マウスを抱水クロラル麻酔下にて、右心房を切開し、左心室から体重量と同量 (1 mL/g) の PBS (-) を灌流することにより脱血した後、線条体を摘出し、組織重量の 10 倍量の lysis buffer (10 mM HEPES-HCl、1% NP-40、1.5 mM MgCl₂、10 mM KCl、500 µM dithiothreitol、1 mM PMSF、pH 7.5) を加え、ホモジナイザーを用いて組織をホモジナイズした。氷上で 20 分間静置した後、4°C、500 × g で 5 分間遠心し、上清を細胞質画分とした。沈査を 100 µL の lysis buffer で洗浄した後、500 × g で 5 分間遠心し、上清を除去した。沈査に 50 µL の SDS lysis buffer (20 mM Tris-HCl、2% SDS、pH 7.5) を加え、10 分間ボーリングした。20°C、17,400 × g で 5 分間遠心し、上清を核画分とした。また、摘出した線条体に組織重量の 10 倍量の SDS lysis buffer を加えホモジナイズし、10 分間ボーリングした。室温、17,400 × g で 5 分間遠心し、その上清を whole cell lysate とした。

8) Western blotting

第一章と同様の方法で、蛋白質バンドを検出した。

9) 間接蛍光抗体法による免疫組織染色

薬物投与後、マウスを抱水クロラル麻酔下にて、右心房を切開し、左心室から体重量と同量 (1 mL/g) の PBS (-) を灌流することにより脱血した後、さらに、体重量と同量 (1 mL/g) の 4% パラホルムアルデヒド (PFA) を灌流し、固定した。脳を摘出後、4% PFA で後固定した後 (4°C、overnight)、30% スクロースを含む PBS (-) に 24 時間浸漬した。OCT コンパウンドを用いて -80 °C で脳を急速凍結した後、クライオスタットを用いて 10 μ m の厚さの切片を作製し、スライドガラスに貼付し、乾燥させた (室温、30 分)。切片を 0.1% Triton-X 100 を含む TBS で洗浄した後、1% FBS、0.5% Triton-X を含む TBS でブロッキングを行い (室温、1 時間)、1% FBS、0.5% Triton-X を含む TBS で希釈した抗 Iba-1 抗体 (1:500) と 4°C で一晩反応させた。切片を 0.1% Triton-X 100 を含む TBS で洗浄した後、1% FBS、0.5% Triton-X を含む TBS で希釈した Alexa Fluor 568 標識抗 rabbit IgG 抗体 (1:300) と室温で 2 時間反応させた。切片を 0.1% Triton-X 100 を含む TBS で洗浄した後、フルオロマウントを用いて封入し、蛍光顕微鏡で観察した。Iba-1 陽性細胞数を計測後、1 mm² あたりの細胞数を算出しグラフ化した。

10) 間接酵素抗体法による免疫組織染色

薬物投与後、マウスを抱水クロラル麻酔下にて、右心房を切開し、左心室から体重量と同量 (1 mL/g) の PBS (-) を灌流することにより脱血した後、さらに、体重量と同量 (1 mL/g) の 4% PFA を灌流し、固定した。脳を摘出後、4% PFA で後固定した後 (4°C、overnight)、30% スクロースを含む PBS (-) に 24 時間浸漬した。OCT コンパウンドを用いて -80°C で脳を急速凍結した後、クライオスタットを用いて 30 μ m の厚さで連続切片を作製し、切片を PBS (-) に浮遊させた。切片を PBS (-) で洗浄した後、0.09% H₂O₂ を含む PBS (-) 溶液で 20 分間インキュベートすることにより内因性 peroxidase を不活性化した。PBS (-) で洗浄後、1% FBS、0.5% Triton-X を含む TBS でブロッキングを行い (室温、30 分)、1% FBS、0.5% Triton-X を含む TBS で希釈した抗 TH 抗体 (1:300) 及び抗 Iba-1 抗体 (1:500) と 4°C で一晩反応させた。切片を PBS (-) で洗浄した後、1% FBS、0.5% Triton-X を含む TBS で希釈した HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体 (1:200) と室温で 1 時間反応させた。切片を 0.1% Triton-X 100 を含む TBS で洗浄した後、ImpactTM DAB (Vector Laboratories, CA, USA) を用いて発色させた。切片をスライドガラスに貼付し、乾燥させた後 (室温、overnight)、Hematoxylin により対比染色を行い、ethanol による脱水及び xylene による透徹後、マウントクイック (Daido Sangyo, Tokyo, Japan) により封入し、光学顕微鏡で観察した。黒質の TH 陽性細胞数は、作製した黒質の連続切片のうちの三分の一の枚数を計測後、黒質あたりの数を算出しグラフ化した。線条体の TH の染色強度の計測及び Iba-1

陽性細胞数の計測では、投与位置から前方 0.7 mm、後方 1.8 mm 内の線条体より、クライオスタットを用いて 30 μ m の厚さで連続切片を作製し、10 枚に 1 枚を染色し、各検討で 8 枚/個体の切片を計測した。TH の染色強度は、Image J software を用いて、DAB の染色像を抽出し、デンシトメーターにより定量化した。Iba-1 陽性細胞数の計測は、上記 9) の方法に準じて行った。

11) データ解析

実験結果は、3-7 例の平均値 \pm S.E.M. として表し、第一章と同様の方法で有意差検定を行った。

実験結果

2.1 脳内での炎症性サイトカイン産生に対するドパミン神経障害の影響

MPTP はドパミン神経細胞を選択的に障害し、パーキンソン病と類似した行動障害を引き起こすことが知られている^{108, 109}。そこで、脳内での炎症性サイトカイン産生に対する内因性のドパミンの影響を検討する目的で、マウス腹腔内に MPTP を投与することによりドパミン神経障害を誘導した。

マウス腹腔内に MPTP (25 mg/kg × 4) を投与し、3 日後にローターロッド試験により運動機能を評価した。MPTP 投与群のマウスの運動機能は、対照群と比較して有意に低下していた (Fig. 27)。中脳における tyrosine hydroxylase (TH) 及び dopamine transporter (DAT) の mRNA 量を real-time RT-PCR 法により検討した結果、MPTP 投与 3 日後において、中脳の TH 及び DAT の mRNA 量は、対照群と比較して有意に減少していた (Fig. 28A, B)。また、黒質における TH 陽性細胞数を免疫組織化学的手法により検討した結果、MPTP 投与 3 日後において、黒質の TH 陽性細胞数は、対照群と比較して有意に減少していた (Fig. 29)。これらの結果から、MPTP 投与によりドパミン神経障害が誘導され、脳内ドパミン量が減少することにより運動機能が障害されていることが示唆された。

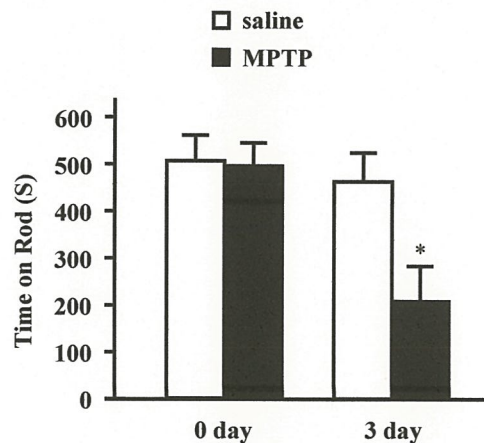


Figure. 27 MPTP induces motor dysfunction in C57BL/6 mice.

Mice were administered with 25 mg/kg MPTP i.p. four times at 2 h intervals. Motor function was assessed by rotarod test 3 days after MPTP administration. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. * $P < 0.05$ vs. saline-administrated control at 3 day.

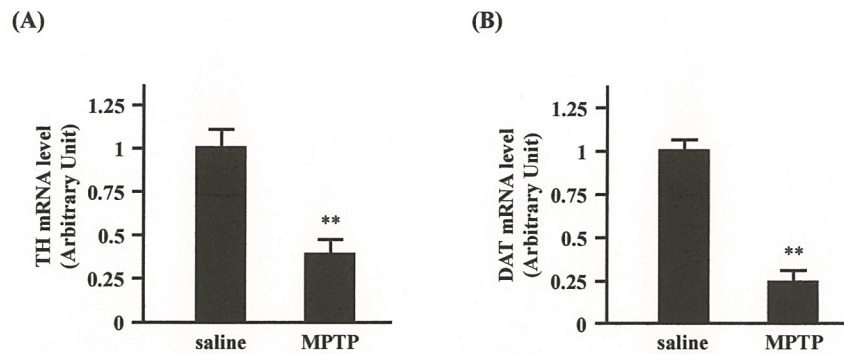


Figure. 28 MPTP decreases mRNA levels of TH and DAT in midbrain.

Mice were administered with 25 mg/kg MPTP i.p. four times at 2 h intervals. Mice were sacrificed 3 days after MPTP administration, and the mRNA levels of TH (A) and DAT (B) in midbrain were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of TH and DAT were normalized to β -actin and were expressed as relative to the expression level of saline, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 6 independent experiments. ** $P < 0.01$ vs. saline-administrated control.

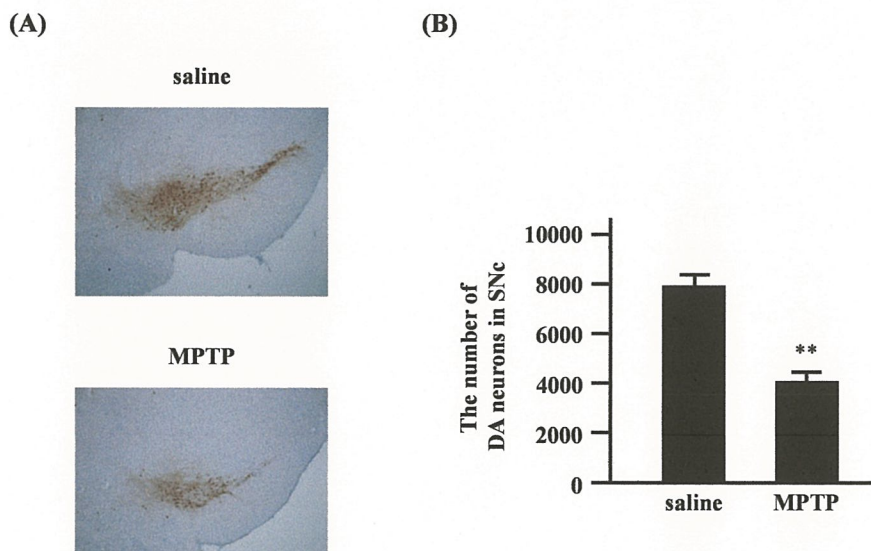


Figure. 29 MPTP induced loss of DA neurons in midbrain.

Mice were administered with 25 mg/kg MPTP i.p. four times at 2 h intervals. (A) Mice were sacrificed 3 days after MPTP administration, and brain sections were immunostained for TH. Representative photographs of TH expression in substantia nigra in control and MPTP-treated mice are shown. Results show photographs representative of 3 independent experiments. (B) The number of TH-positive cells in the substantia nigra is shown. Results show the mean \pm s.e. obtained from 3 independent experiments. ** $P < 0.01$ vs. saline-administrated control.

マウスに LPS を腹腔内投与することにより、海馬や大脳皮質において TNF- α 、IL-1 β 及び IL-6 等の炎症性サイトカインが産生されることが知られている¹¹⁰⁻¹¹²⁾。そこで、線条体での炎症性サイトカイン産生に対する LPS 腹腔内投与の影響について、real-time RT-PCR 法により検討した。LPS (5 mg/kg) 腹腔内投与により、線条体の TNF- α 、IL-1 β 及び IL-6 mRNA 量は、投与 3 時間後をピークとして一過性に増加した (Fig. 30A - C)。次に、MPTP 投与によりドパミン神経障害を誘導したマウスを用いて、LPS 腹腔内投与による線条体での炎症性サイトカイン産生に対するドパミン神経障害の影響について real-time RT-PCR 法により検討した。LPS (5 mg/kg) 投与 3 時間後における線条体の TNF- α 及び IL-1 β の mRNA 量の増加は、MPTP (25 mg/kg \times 4) 投与群で有意に促進された (Fig. 31A, B)。また、LPS 投与による IL-6 mRNA 量の増加も、MPTP 投与群で促進される傾向を示した (Fig. 31C)。

次に、線条体のキノプロテイン量に対する MPTP 投与の影響について、NBT/glycinate assay により検討した。MPTP (25 mg/kg \times 4) 投与 3 日後において、線条体のキノプロテイン量は、対照群と比較して有意に減少していた (Fig. 32)。

これらの結果から、ドパミン神経が障害されることにより、ドパミンキノンの生成を介した蛋白質のキノプロテイン化が減少した結果、内因性ドパミンによる炎症性サイトカイン産生抑制作用が減弱し、LPS 投与による線条体での炎症性サイトカイン産生が促進することが示唆された。

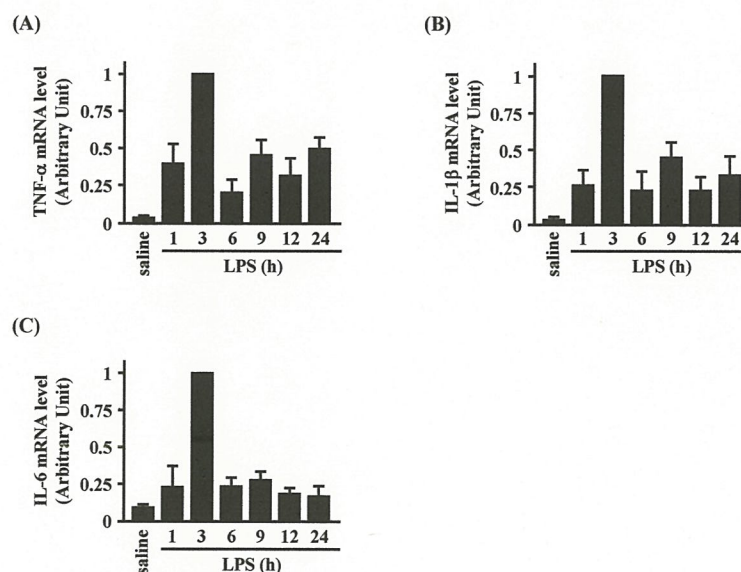


Figure. 30 LPS induces mRNA expression of cytokines in striatum.

Mice were administered with 5 mg/kg LPS i.p. Mice were sacrificed at the indicated times after LPS administration, and the mRNA levels of TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C) in striatum were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of cytokines were normalized to β -actin and were expressed as relative to the maximum expression level, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 3 independent experiments.

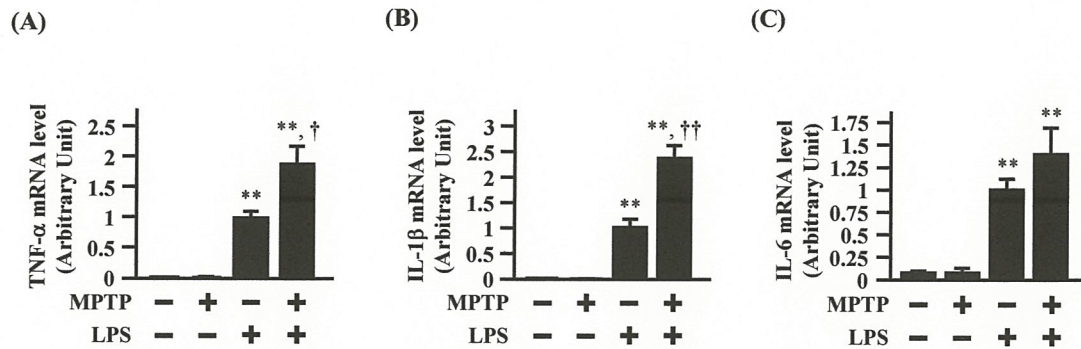


Figure. 31 Loss of dopaminergic neuron enhances the LPS-induced mRNA expressions of cytokines in striatum.

Mice were administered with 25 mg/kg MPTP i.p. four times at 2 h intervals. LPS (5 mg/kg) was administered i.p. 3 days after MPTP administration. Mice were sacrificed 3 h after LPS administration, and the mRNA levels of TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C) in striatum were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of cytokines were normalized to β -actin and were expressed as relative to the expression level of LPS-administrated group, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4-6 independent experiments. ** P < 0.01 vs. saline-administrated control, † P < 0.05 and †† P < 0.01 vs. LPS-administrated group.

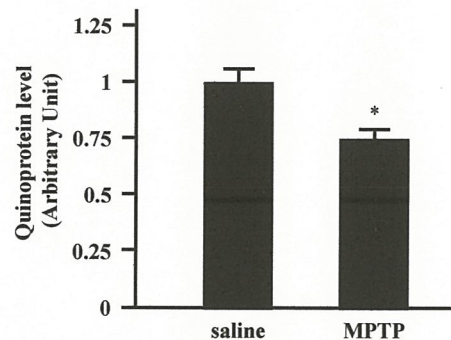


Figure. 32 Loss of dopaminergic neuron decreases the level of quinoprotein in striatum.

Mice were administered with 25 mg/kg MPTP i.p. four times at 2 h intervals. Mice were sacrificed 3 days after MPTP administration, and the quinoprotein level in striatum was determined by NBT/glycinate assay. The quinoprotein level was expressed as relative to the level of saline, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. * P < 0.05 vs. saline-administrated control.

2.2 脳内での炎症性サイトカイン産生に対する L-dopa 投与の影響

ラットやネコにおいて、L-dopa を腹腔内投与することにより脳内のドパミン量が増加すること、carbidopa の併用によりその増加が著明に促進されることが報告されている^{106, 113)}。そこで、脳内ドパミン量を増加させることで炎症性サイトカイン産生を抑制することができるか否かを明らかにする目的で、LPS の腹腔内投与による線条体でのサイトカイン産生増加に対する L-dopa 及び L-dopa と carbidopa 投与の影響について、real-time RT-PCR 法により検討した。

LPS (5 mg/kg) 投与 3 時間後における線条体の TNF- α 、IL-1 β 及び IL-6 の mRNA 量の増加は、L-dopa (50 mg/kg) 単独投与群及び carbidopa (5 mg/kg) 単独投与群では変化がみられなかったが、L-dopa/carbidopa (50 mg/kg, 5 mg/kg) 投与群で有意に抑制された (Fig. 33A - C)。また、L-dopa 及び carbidopa 投与による線条体のキノプロテイン量に対する影響について、NBT/glycinate assay により検討した。線条体のキノプロテイン量は、L-dopa 単独投与群及び carbidopa 単独投与群では変化がみられなかったが、L-dopa/carbidopa 投与群において有意に増加していた (Fig. 34)。さらに、線条体から調製した各細胞画分における NF- κ B p65 量及び I κ B α 量に対する LPS 及び L-dopa/carbidopa 投与の影響について、Western blotting により検討した。LPS 投与 1 時間後における細胞質画分及び whole cell lysate の NF- κ B p65 量は変化しなかったが、核画分の NF- κ B p65 量は増加し、この核画分での NF- κ B p65 量の増加は、L-dopa/carbidopa 投与群では抑制された (Fig. 35)。また、whole cell lysate の I κ B α 量は、LPS 投与により減少したが、この減少は L-dopa/carbidopa 投与群でも同様にみられた。

マウスに LPS を投与することにより、海馬や大脳皮質においてミクログリアのマーカーである Iba-1 陽性細胞数が増加することが報告されている^{114, 115)}。次に、LPS 投与後の線条体でのミクログリアの活性化について、抗 Iba-1 抗体を用いて免疫組織化学的手法により検討した。LPS (5 mg/kg) 投与 24 時間後において、線条体での Iba-1 陽性細胞は、細胞体が肥大化しており、ミクログリアの活性化の典型的な形態変化を示していた (Fig. 36A)。また、線条体での Iba-1 陽性細胞数は LPS 投与により著明に増加した (Fig. 36B)。この LPS 投与による Iba-1 陽性細胞の形態変化及び Iba-1 陽性細胞数の増加は、L-dopa/carbidopa (50 mg/kg, 5 mg/kg) 投与群で抑制された。これらの結果から、ドパミンは脳内において、ドパミンキノンによる蛋白質のキノプロテイン化を介して NF- κ B の核移行を阻害することにより、ミクログリアからの炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。

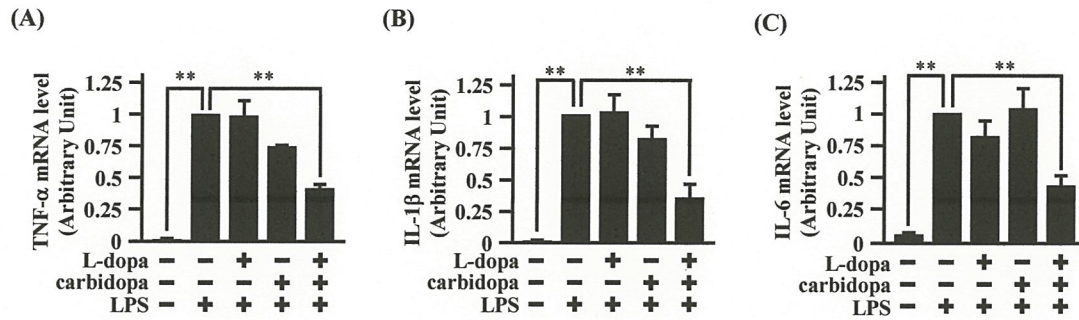


Figure. 33 Effects of L-dopa and carbidopa on LPS-induced mRNA expressions of cytokines in striatum.

Mice were administered with 50 mg/kg L-dopa and/or 5 mg/kg carbidopa i.p. once a day for 3 days. LPS (5 mg/kg) was administered i.p. 2 h after the final administration of the drugs. Mice were sacrificed 3 h after LPS administration, and the mRNA levels of TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C) in striatum were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of cytokines were normalized to β -actin and were expressed as relative to the expression level of LPS alone, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 3 independent experiments. $**P < 0.01$

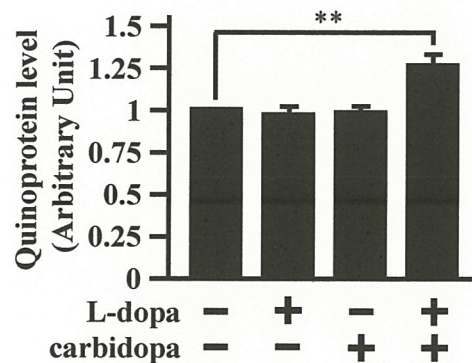


Figure. 34 Effects of L-dopa and carbidopa on the level of quinoprotein in striatum.

Mice were administered with 50 mg/kg L-dopa and/or 5 mg/kg carbidopa i.p. once a day for 3 days. Mice were sacrificed 2 h after the final administration of the drugs and the quinoprotein level in striatum was determined by NBT/glycinate assay. The quinoprotein level was expressed as relative to the level of saline, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. $**P < 0.01$

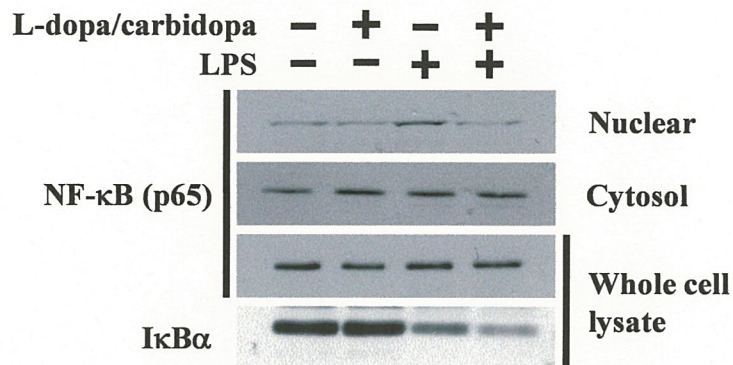


Figure. 35 Effects of L-dopa and carbidopa on translocation of NF- κ B p65 subunit and degradation of I κ B α by LPS in striatum.

Mice were administered with 50 mg/kg L-dopa and/or 5 mg/kg carbidopa i.p. once a day for 3 days. LPS (5 mg/kg) was administered i.p. 2 h after the final administration of the drugs. Mice were sacrificed 1 h after LPS administration, and the brain tissues were subjected to subcellular fractionation. The fractions were analyzed by Western blotting with anti-NF- κ B p65 and anti-I κ B α antibodies. Results show blots representative of 3 independent experiments.

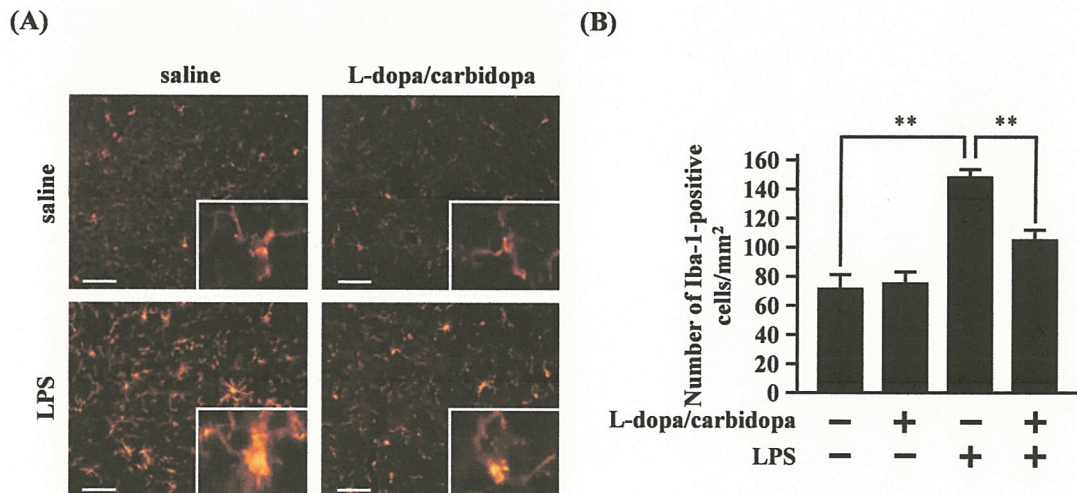


Figure. 36 Effects of L-dopa and carbidopa on LPS-induced activation of microglia in striatum.

Mice were administered with 50 mg/kg L-dopa and 5 mg/kg carbidopa i.p. once a day for 3 days. LPS (5 mg/kg) was administered i.p. 2 h after the final administration of the drugs. Mice were sacrificed 24 h after LPS administration, brain sections were immunostained for Iba-1. (A) Representative photomicrographs of Iba-1 expression in striatum are shown. Results show photographs representative of 4 independent experiments. Scale bar, 50 μ m. (B) The number of Iba-1-positive cells in striatum is shown. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. ** P < 0.01

次に、L-dopa/carbidopa 投与による線条体での炎症性サイトカイン産生抑制作用が、他の脳部位でもみられるか否かを明らかにする目的で、LPS 腹腔内投与による海馬、大脳皮質及び中脳での炎症性サイトカイン産生に対する L-dopa/carbidopa 投与の影響について、real-time RT-PCR 法により検討した。

LPS (5 mg/kg) 投与により、3 時間後の海馬、大脳皮質及び中脳の TNF- α 及び IL-1 β mRNA 量は増加した (Fig. 37)。これらのサイトカイン mRNA 量の増加は、L-dopa/carbidopa (50 mg/kg, 5 mg/kg) 投与群で有意に抑制された (Fig. 37)。これらの結果から、L-dopa/carbidopa は、脳内において線条体以外の他の部位においても、ミクログリアによる炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。

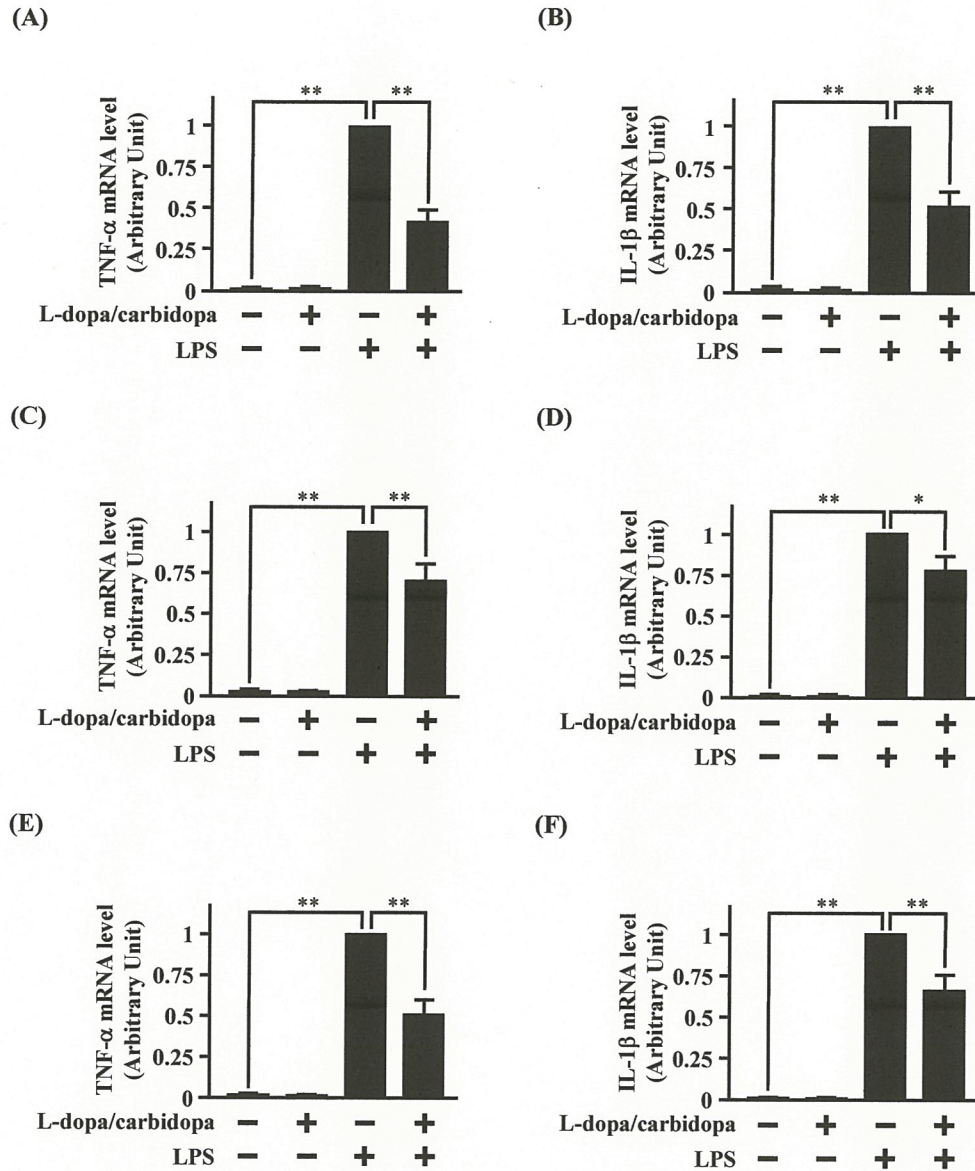


Figure. 37 Effects of L-dopa and carbidopa on LPS-induced mRNA expressions of cytokines in hippocampus, cerebral cortex and midbrain.

Mice were administered with 50 mg/kg L-dopa and 5 mg/kg carbidopa i.p. once a day for 3 days. LPS (5 mg/kg) was administered i.p. 2 h after the final administration of the drugs. Mice were sacrificed 3 h after LPS administration, and the mRNA levels of TNF- α (A, C, E) and IL-1 β (B, D, F) in hippocampus (A, B), cerebral cortex (C, D) and midbrain (E, F) were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of cytokines were normalized to β -actin and were expressed as relative to the expression level of LPS alone, which was arbitrarily set as 1.0. Results show the mean \pm s.e. obtained from 3 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 LPS 線条体内投与による線条体でのサイトカイン産生及びドパミン神経障害に対する L-dopa/carbidopa 前投与の影響

L-dopa/carbidopa を用いた臨床研究である ELLDOPA study (the Earlier versus Later Levodopa Therapy in Parkinson Disease) において、L-dopa/carbidopa がパーキンソン病患者に対してドパミン神経保護的に作用する可能性が示されている¹¹⁶⁾。また、マウス線条体内に LPS を投与することにより、線条体で TNF- α 及び IL-1 β が産生されること、ミクログリアの活性化がみられること及びドパミン神経障害が誘導されることが報告されている¹¹⁷⁻¹²⁰⁾。そこで、L-dopa/carbidopa がミクログリアの炎症性サイトカイン産生を抑制し、ドパミン神経保護作用を示すか否かを明らかにする目的で、LPS 線条体内投与による炎症性サイトカイン産生に対する L-dopa/carbidopa 投与の影響について、real-time RT-PCR 法により検討した。

LPS (25 μ g) の線条体内投与により、投与 14 日後の TNF- α 及び IL-1 β mRNA 量は、対側では変化しなかったが、投与側において著明に増加した (Fig. 38)。これらの増加は、L-dopa/carbidopa (50 mg/kg, 5 mg/kg) 前投与群で有意に抑制された (Fig. 38)。

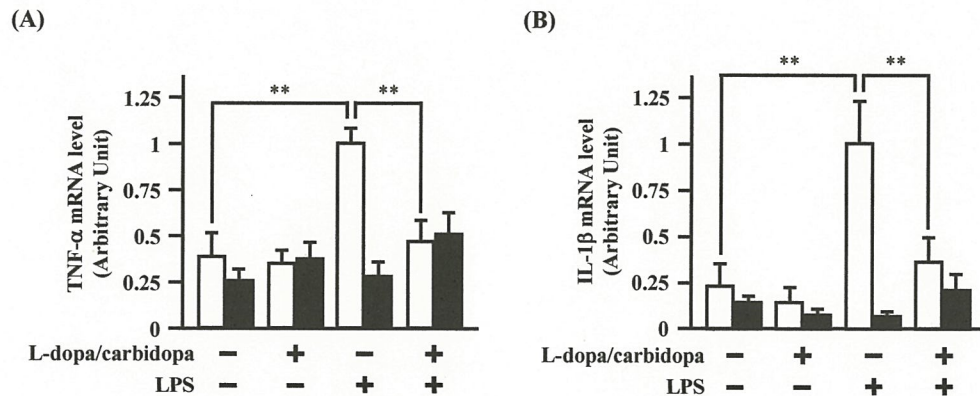


Figure. 38 Effects of L-dopa and carbidopa on intrastriatal LPS administration-induced mRNA expressions of cytokines in striatum.

Mice were administered with 50 mg/kg L-dopa and 5 mg/kg carbidopa i.p. once a day for 3 days. LPS (25 μ g) was administered into the striatum 2 h after the final administration of the drugs. Mice were sacrificed 14 days after LPS administration, and the mRNA levels of TNF- α (A) and IL-1 β (B) in striatum were examined by real-time RT-PCR. The mRNA levels of cytokines were normalized to β -actin and were expressed as relative to the expression level of ipsilateral side of LPS-administered mice, which was arbitrarily set as 1.0. Open column and closed column show ipsilateral and contralateral side of administration, respectively. Results show the mean \pm s.e. obtained from 4 independent experiments. ** $P < 0.01$

次に、LPS 投与後の線条体でのミクログリアの活性化について、抗 Iba-1 抗体を用いて免疫組織化学的手法により検討した。

LPS 投与 14 日後において、投与側の線条体での Iba-1 陽性細胞は、細胞体が肥大化しており、活性化ミクログリアの典型的な形態変化を示していた (Fig. 39A)。また、Iba-1 陽性細胞数は LPS 投与により著明に増加した (Fig. 39B)。この LPS 投与による Iba-1 陽性細胞の形態変化及び細胞数の増加は、L-dopa/carbidopa 前投与群で有意に抑制された。

これらの結果から、L-dopa/carbidopa は、線条体でのミクログリアの活性化を抑制することにより、LPS 線条体内投与による炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。

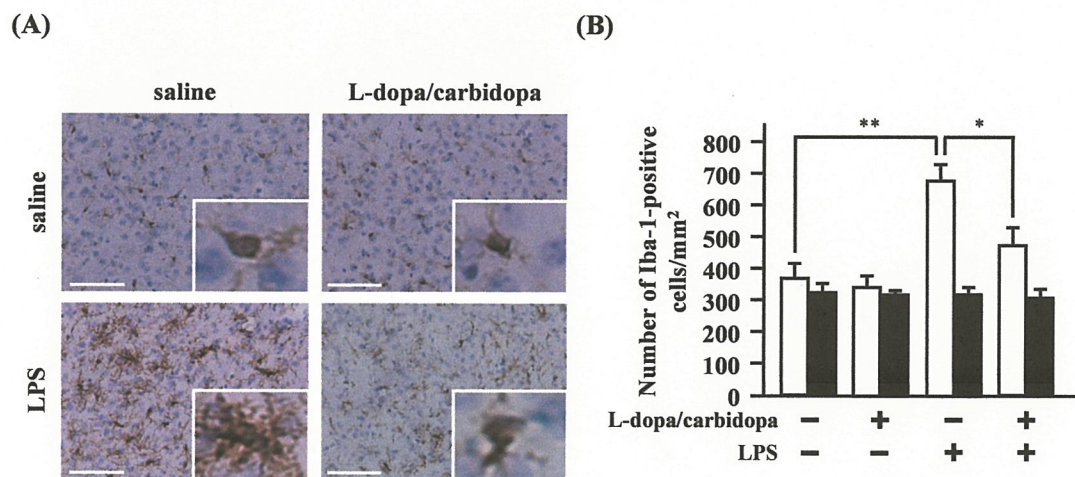


Figure. 39 Effects of L-dopa and carbidopa on intra-striatal LPS administration-induced activation of microglia in striatum.

Mice were administered with 50 mg/kg L-dopa and 5 mg/kg carbidopa i.p. once a day for 3 days. LPS (25 µg) was administered into the striatum 2 h after the final administration of the drugs. Mice were sacrificed 14 days after LPS administration, and 30 µm serial sections were cut through each striatum. Eight sections per mouse with a 300 µm interval were immunostained with anti-Iba-1 antibody. (A) Representative photomicrographs of immunohistochemical staining of Iba-1 in striatum are shown. Scale bar, 50 µm. (B) The number of Iba-1-positive cells in striatum is shown. Open column and closed column show ipsilateral and contralateral side of administration, respectively. Results show photographs representative of 4 to 5 independent experiments or the mean \pm s.e. obtained from 3 to 5 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

次に、LPS 線条体投与後のドパミン神経障害について、抗 TH 抗体を用いて免疫組織化学的手法により検討した。

LPS (25 μ g) 線条体内投与により、投与 14 日後の投与側での TH の免疫染色の強度は、saline 投与群と比較して有意に低下した (Fig. 40)。この LPS 投与による染色強度の低下は、L-dopa/carbidopa (50 mg/kg, 5 mg/kg) 前投与群で有意に抑制された (Fig. 40)。これらの結果から、L-dopa/carbidopa はミクログリアからの炎症性サイトカイン産生を抑制することで、ドパミン神経障害を抑制することが示唆された。

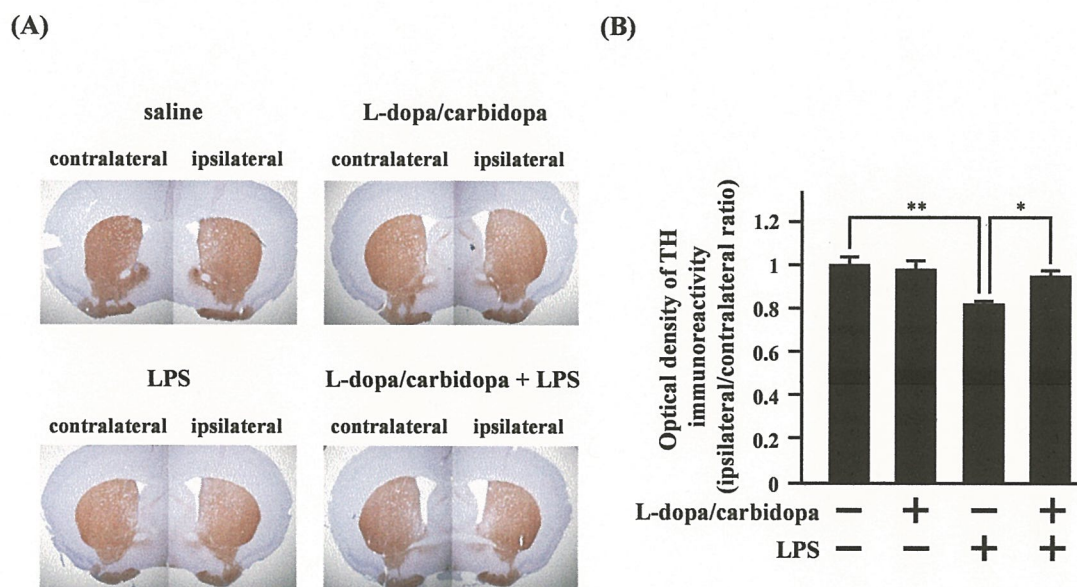


Figure. 40 Effects of L-dopa and carbodopa on intrastriatal LPS administration-induced decrease of TH immunoreactivity in striatum.

Mice were administered with 50 mg/kg L-dopa and 5 mg/kg carbidopa i.p. once a day for 3 days. LPS (25 μ g) was administered into the striatum 2 h after the final administration of the drugs. Mice were sacrificed 14 days after LPS administration, and 30 μ m serial sections were cut through each striatum. Eight sections per mouse with a 300 μ m interval were immunostained with anti-TH antibody. (A) Representative photomicrographs of immunohistochemical staining of TH in striatum are shown. (B) Optical density of TH immunoreactivity (ipsilateral/contralateral ratio) is shown. Results show photographs representative of 6 to 7 independent experiments or the mean \pm s.e. obtained from 6 to 7 independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01

考察

本研究において、マウスに MPTP を投与することにより、運動機能の低下 (Fig. 27)、黒質での TH 陽性細胞数の減少 (Fig. 29)、及び線条体でのキノプロテイン量の減少がみられた (Fig. 32)。また、MPTP 投与によりドパミン神経障害を誘導したマウスでは、LPS 投与による線条体での TNF- α 及び IL-1 β mRNA の発現誘導が促進された (Fig. 30)。これらの結果は、ドパミン神経障害によりドパミン放出量が減少すると、ドパミンキノンの生成を介した蛋白質のキノプロテイン化が抑制され、サイトカイン産生が促進することを示唆している。一方、本研究において、L-dopa を carbidopa と共に腹腔内投与することにより、線条体のキノプロテイン量は増加した (Fig. 34)。また、LPS 腹腔内投与による線条体での炎症性サイトカイン mRNA の発現誘導は、L-dopa/carbidopa 前投与により抑制された (Fig. 33)。これらの結果は、脳内においてドパミンが、ドパミンキノンによる蛋白質のキノプロテイン化を介してミクログリアからの炎症性サイトカイン産生を抑制していることを示唆している。このことは、LPS 腹腔内投与後の線条体でのミクログリアの活性化が、L-dopa/carbidopa 前投与により抑制されたことから支持される (Fig. 36)。以上の結果より、脳内においてドパミンは、炎症性サイトカイン産生の調節因子として重要な役割を果たしていると考えられた。

本研究において、LPS 腹腔内投与による線条体での炎症性サイトカインの発現誘導は、L-dopa 単独投与群では変化がみられなかったが (Fig. 33)、L-dopa/carbidopa 投与群において抑制された (Fig. 33)。この結果は、L-dopa/carbidopa 投与群において脳内のドパミン量が増加し、炎症性サイトカイン産生を抑制していることが示唆される。このことは、線条体のキノプロテイン量が L-dopa 単独投与群では変化せず、L-dopa/carbidopa 投与群において増加したこと (Fig. 34)、ラットに L-dopa を carbidopa と併用投与することにより、L-dopa 単独投与と比べて線条体のドパミン量が著明に増加することからも支持される¹¹³⁾。ドパミンは、ドパミンキノンの生成を介して蛋白質をキノプロテイン化することが知られている^{52, 54)}。また、第一章において、ドパミンはドパミンキノンの生成を介した蛋白質のキノプロテイン化により、炎症性サイトカイン産生を抑制することを示した。一方、L-dopa は自動酸化され、キノン体になることが報告されている¹²¹⁾。本研究において、BV-2 細胞に L-dopa を処置することによりキノプロテイン量が増加すること、LPS 刺激による炎症性サイトカイン mRNA の発現誘導が L-dopa 前処置により抑制されることを明らかにしている (data not shown)。これらのことより、L-dopa/carbidopa 投与による炎症性サイトカイン産生抑制作用は、L-dopa から産生されたドパミン及び L-dopa 自身の両方による作用であることが示唆された。これらの詳細な機構については今後の検討課題ではあるが、本研究の結果より、L-dopa/carbidopa は、蛋白質のキノプロテイン化を介してミクログリアによる炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。

パーキンソン病は、黒質から線条体に投射するドパミン神経細胞からのドパミンの放出

量が減少することにより発症することが知られている¹²²⁾。また、パーキンソン病患者の脳では、黒質で活性化ミクログリアが観察されること¹²³⁾、線条体及び黒質で TNF- α 、IL-1 β 及び IL-6 等の炎症性サイトカインが増加していることが報告されている^{18, 20)}。さらに、パーキンソン病マウスモデルにおいて、IL-1 β がドパミン神経障害を促進することが報告されている⁸⁴⁾。これらの報告と本研究の結果から、パーキンソン病患者の脳では、ドパミンの放出量が減少した結果、活性化ミクログリアによる炎症性サイトカイン産生が促進し、ドパミン神経障害が増悪している可能性が考えられた。このことは、L-dopa を 40 週間投与したパーキンソン病患者では、プラセボ投与群と比較して、2 週間の休薬期間後に評価したパーキンソン病症状の悪化が抑制されていたこと¹¹⁶⁾、パーキンソン病の初期治療を L-dopa/carbidopa で開始したほうがドパミンアゴニストあるいは MAO-B 阻害薬で開始した場合と比較して、パーキンソン病患者の長期の症状コントロールに優れ、症状の進行を遅らせることから支持される¹²⁴⁾。本研究において、L-dopa/carbidopa は、LPS 線条体内投与による線条体でのミクログリアの活性化、サイトカイン mRNA 量の増加及び TH の免疫染色強度の低下を抑制した (Fig. 38 - 40)。これらのことから、L-dopa/carbidopa は、パーキンソン病において、ミクログリアからの炎症性サイトカイン産生抑制を介して、ドパミン神経細胞障害を抑制し、疾患の進行を抑制することが示唆された。

アルツハイマー病やハンチントン病患者の脳において、ドパミン神経細胞の脱落によりドパミン量が減少していること^{89, 92-94)}、両疾患患者の脳の病変部位において、活性化ミクログリアが観察され^{125, 126)}、TNF- α 、IL-1 β 及び IL-6 等の炎症性サイトカインが増加していることが報告されている^{15, 127)}。さらに、抗 TNF- α 製剤のエタネルセプトが、アルツハイマー病患者の認知機能低下を改善すること¹²⁸⁾、TNF- α の細胞内シグナルを抑制する化合物が、ハンチントン病モデルマウスの神経細胞死を抑制することが報告されている¹²⁹⁾。これらの報告と本研究の結果から、アルツハイマー病やハンチントン病患者において、脳内でのドパミンの放出量が減少した結果、活性化ミクログリアによる炎症性サイトカイン産生が促進し、神経障害が増悪している可能性が考えられた。また、筋萎縮性側索硬化症及び多発性硬化症患者の脳内において、TNF- α 、IL-1 β 及び IL-6 等の炎症性サイトカインが増加していること¹³⁰⁻¹³²⁾、これらの疾患の動物モデルにおいて、炎症性サイトカインが神経障害の増悪に関与することが報告されている^{83, 133)}。また、本研究において、L-dopa/carbidopa 投与は、海馬、大脳皮質及び中脳での LPS 腹腔内投与による炎症性サイトカイン産生を抑制した (Fig. 37)。これらのことから、L-dopa/carbidopa は様々な神経変性疾患において、炎症性サイトカインの産生を抑制することにより、神経細胞死を抑制し、疾患の進行を抑制する新たな治療薬となる可能性が考えられた。

総括

ミクログリアは、NO や炎症性サイトカイン産生を介して、脳の感染防御及び炎症制御に重要な役割を果たしている⁸⁾。一方、活性化ミクログリアにより産生された過剰な NO や炎症性サイトカインが、神経変性疾患における神経細胞死に深く関与すると考えられている^{15, 17, 18, 20, 134)}。これらのことから、ミクログリアからの NO や炎症性サイトカイン産生を抑制する生体内機構は、神経変性疾患での神経細胞死を抑制する新たな治療標的となる可能性が考えられる。ドパミンは神経細胞だけでなくミクログリアにも作用し、その機能調節に関わることが示唆されている。また、種々の神経変性疾患や脳障害時にドパミン神経細胞からのドパミンの放出量が増減することが示されている^{31, 32, 89-94)}。これらのことから、ドパミンによるミクログリアの機能調節を明らかにすることは、神経変性疾患や脳障害の病態生理を解明する上で重要であると考えられる。

本研究では、ドパミンによるミクログリアの機能調節を明らかにすることを目的とし、*in vitro* 及び *in vivo* の系を用いて、ミクログリアの NO 及び炎症性サイトカイン産生に対するドパミンの影響を検討した。第一章では、マウスミクログリア株 BV-2 細胞において、ドパミンの前処置が LPS 刺激による NO 及び炎症性サイトカイン産生を抑制することを示した。このドパミンの作用には、ドパミン受容体は関与せず、ドパミンの酸化により生成したドパミンキノンによる蛋白質のキノプロテイン化が関与する可能性を示した。また、ドパミンは NF- κ B の核移行を抑制することを明らかにし、これらのドパミンの作用はマウス初代培養ミクログリアでも同様に観察されることを示した。さらに、NF- κ B は微小管を介して核移行すること、ドパミンはこの微小管を介した NF- κ B の核への輸送を抑制することを明らかにした。これらの結果は、ミクログリアにおいてドパミンは、ドパミンキノンによる蛋白質のキノプロテイン化により、微小管を介した NF- κ B の核への輸送を抑制し、NO や炎症性サイトカイン産生を抑制することを示唆している (Fig. 41)。

第二章では、ドパミンによる炎症性サイトカイン産生抑制作用が *in vivo* でもみられるか否かについて検討した。その結果、L-dopa/carbidopa 投与により、マウス線条体でのキノプロテイン量が増加し、LPS 腹腔内投与による線条体でのミクログリアの活性化及び炎症性サイトカイン産生が抑制されることを明らかにした。また、MPTP 投与によりドパミン神経障害を誘導したマウスでは、線条体でのキノプロテイン量が減少し、LPS 腹腔内投与による線条体での炎症性サイトカイン産生が促進されることを明らかにした。これらの結果は、ドパミンが、ドパミンキノンの生成を介して蛋白質をキノプロテイン化し、ミクログリアによる炎症性サイトカイン産生を抑制することで脳内での炎症反応の制御に重要な役割を担うことを示唆している。さらに、L-dopa/carbidopa による炎症性サイトカイン産生抑制作用が、パーキンソン病におけるドパミン神経障害の抑制に有用であるか否かについて検討した。その結果、L-dopa/carbidopa 投与が、LPS 線条体内投与によりみられたマウス線条体でのミクログリアの活性化、炎症性サイトカイン産生及びドパミン神経障害を抑制す

ることを明らかにした。これらの結果は、L-dopa/carbidopa が、ミクログリアによる炎症性サイトカイン産生を抑制することで、パーキンソン病におけるドパミン神経細胞障害を抑制することを示唆している。

パーキンソン病では、活性化ミクログリアにより産生された NO や炎症性サイトカインがドパミン神経細胞の障害を増悪し、疾患の進行に関与すると考えられている^{18, 20, 134)}。また、L-dopa/carbidopa を用いた臨床研究では、L-dopa/carbidopa がパーキンソン病患者の症状の進行を遅らせ、ドパミン神経保護的に働く可能性が示されている^{116, 124)}。これらの報告と本研究の結果から、L-dopa/carbidopa は、ミクログリアからの炎症性サイトカイン産生抑制を介して神経保護作用を示すことが示唆され、L-dopa/carbidopa はパーキンソン病の治療において、対症療法としてだけでなく原因療法としても有用であることが考えられた。また、活性化ミクログリアにより産生される炎症性サイトカインは、脳内の持続的な炎症を誘発し、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症等の神経変性疾患での神経細胞死を促進すると考えられている^{15, 17, 135)}。また、本研究において、L-dopa/carbidopa によるミクログリアからの炎症性サイトカイン産生抑制作用は、線条体だけでなく海馬、大脳皮質及び中脳でも認められた。これらのことより、L-dopa/carbidopa は、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症等の神経変性疾患においても、炎症性サイトカインの産生を抑制することにより、神経細胞死を抑制する治療薬となる可能性が考えられた。今後、様々な神経変性疾患において、L-dopa/carbidopa の有用性が明らかになり、神経変性疾患の進行を抑制する治療薬として臨床応用されることが期待される。

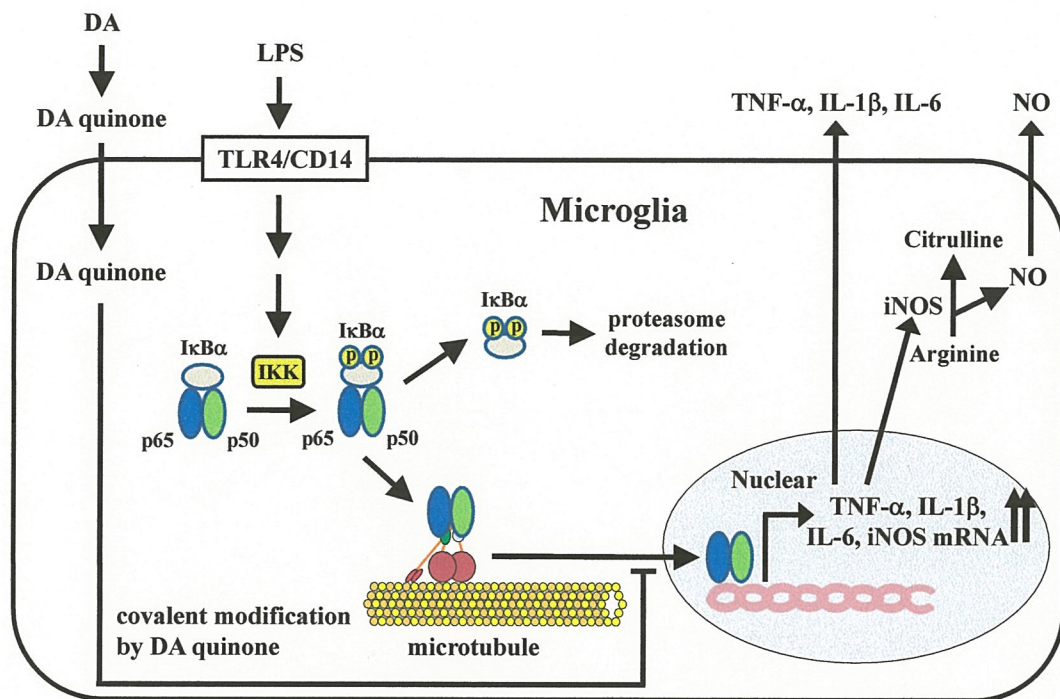


Figure. 41 A schematic representation of DA-induced attenuations of NO production and cytokine expression in microglia.

謝辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました、摂南大学薬学部薬物治療学研究室教授、前田定秋先生に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、直接のご指導を賜りました摂南大学薬学部薬物治療学研究室准教授、吉岡靖啓先生に深謝致します。

また、本研究を進めるにあたり、ご討論、ご指導戴きました摂南大学薬学部薬物治療学研究室助手、山室晶子先生、同助教、石丸侑希先生に感謝致します。

また、本研究を進めるにあたり、ご討論、ご指導戴きました大阪大学大学院薬学研究科、神経薬理学分野助教、笠井淳司先生に感謝致します。

最後に、多大なるご協力とご援助戴きました、戸澤梓修士、西元和哉学士、西澤拓真学士、和田祥子学士、小寺祥悟学士、山田穰学士、山下和純学士、田村茉奈美学士、柿迫大樹氏、三木佑莉氏を始めとする摂南大学薬学部薬物治療学研究室の皆様へ感謝致します。

引用文献

1. Hirrlinger J., Gutterer JM., Kussmaul L., Hamprecht B. and Dringen R. (2000). Microglial cells in culture express a prominent glutathione system for the defense against reactive oxygen species. *Dev Neurosci.*, **22**(5-6):384-92.
2. Villegas SN., Poletta FA. and Carri NG. (2003). GLIA: A reassessment based on novel data on the developing and mature central nervous system. *Cell Biol Int.*, **27**(8):599-609.
3. Bessis A., Béchade C., Bernard D. and Roumier A. (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia.*, **55**(3):233-8.
4. Katsuura G., Gottschall PE., Dahl RR. and Arimura A. (1989). Interleukin-1 beta increases prostaglandin E2 in rat astrocyte cultures: modulatory effect of neuropeptides. *Endocrinology.*, **124**(6):3125-7.
5. Neophytou C., Vernallis AB., Smith A. and Raff MC. (1997). Müller-cell-derived leukaemia inhibitory factor arrests rod photoreceptor differentiation at a postmitotic pre-rod stage of development. *Development.*, **124**(12):2345-54.
6. Kim JS., Ohshima S., Pediaditakis P. and Lemasters JJ. (2004). Nitric oxide protects rat hepatocytes against reperfusion injury mediated by the mitochondrial permeability transition. *Hepatology.*, **39**(6):1533-43.
7. MacMicking J., Xie QW. and Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.*, **15**:323-50.
8. Snyder SH. (1992). Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science.*, **257**(5069):494-6.
9. Bredt DS. (1999). Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res.*, **31**(6):577-96.
10. Strolin Benedetti M., Dostert P., Marrari P. and Cini M. (1993). Effect of ageing on tissue levels of amino acids involved in the nitric oxide pathway in rat brain. *J Neural Transm Gen Sect.*, **94**(1):21-30.
11. Dinarello CA., Kluger MJ. and Powanda MC. (1990). The Physiological and Pathological Effects of Cytokines. *New York: Liss.*
12. Foster JR. (2001). The functions of cytokines and their uses in toxicology. *Int J Exp Pathol.*, **82**(3):171-192.
13. Johnston GR. and Webster NR. (2009). Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. *Br J Anaesth.*, **102**(4):453-62.
14. Meager T. (1998). The Molecular Biology of Cytokines. *Chichester, New York: John Wiley & Sons.*
15. Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole GM., Cooper NR., Eikelenboom P.,

- Emmerling M., Fiebich BL., Finch CE., Frautschy S., Griffin WS., Hampel H., Hull M., Landreth G., Lue L., Mrak R., Mackenzie IR., McGeer PL., O'Banion MK., Pachter J., Pasinetti G., Plata-Salaman C., Rogers J., Rydel R., Shen Y., Streit W., Strohmeyer R., Tooyoma I., Van Muiswinkel FL., Veerhuis R., Walker D., Webster S., Wegrzyniak B., Wenk G. and Wyss-Coray T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.*, **21**(3):383–421.
16. Good PF., Hsu A., Werner P., Perl DP. and Olanow CW. (1998). Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.*, **57**(4):338-42.
 17. Heneka MT. and O'Banion MK. (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol.*, **184**(1–2):69–91.
 18. Hirsch EC., Hunot S., Damier P. and Faucheux B. (1998). Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Ann Neurol* **44**:S115-20
 19. Malinski T. (2007). Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*, **11**(2):207-18.
 20. Mogi M., Harada M., Riederer P., Narabayashi H., Fujita K. and Nagatsu T. (1994). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett.*, **165**:208-10.
 21. Maiese K., Boniece IR., Skurat K. and Wagner JA. (1993). Protein kinases modulate the sensitivity of hippocampal neurons to nitric oxide toxicity and anoxia. *J Neurosci Res.*, **36**(1):77-87.
 22. Schulz JB., Matthews RT., Muqit MM., Browne SE. and Beal MF. (1995). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J Neurochem.*, **64**(2):936-9.
 23. Ye L., Huang Y., Zhao L., Li Y., Sun L., Zhou Y., Qian G. and Zheng JC. (2013). IL-1 β and TNF- α induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *J Neurochem.*, **125**(6):897-908.
 24. Fujita H., Tanaka J., Maeda N. and Sakanaka M. (1998). Adrenergic agonists suppress the proliferation of microglia through beta 2-adrenergic receptor. *Neurosci Lett.*, **242**(1):37-40.
 25. Shytle RD., Mori T., Townsend K., Vendrame M., Sun N., Zeng J., Ehrhart J., Silver AA., Sanberg PR. and Tan J. (2004). Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *J Neurochem.*, **89**(2):337-43.
 26. Tanaka KF., Kashima H., Suzuki H., Ono K. and Sawada M. (2002). Existence of functional beta1- and beta2-adrenergic receptors on microglia. *J Neurosci Res.*, **70**(2):232-7.
 27. Cachope R. and Cheer JF. (2014). Local control of striatal dopamine release. *Front Behav Neurosci.*, **8**:188
 28. Rice ME., Patel JC. and Cragg SJ. (2011). Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience.*, **198**:112-37.

29. Zoli M., Torri C., Ferrari R., Jansson A., Zini I., Fuxe K. and Agnati LF. (1998). The emergence of the volume transmission concept. *Brain Res Brain Res Rev.*, **26(2-3)**:136-47.
30. Mastroeni D., Grover A., Leonard B., Joyce JN., Coleman PD., Kozik B., Bellinger DL. and Rogers J. (2009). Microglial responses to dopamine in a cell culture model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.*, **30(11)**:1805-17.
31. Sarna GS., Obrenovitch TP., Matsumoto T., Symon L. and Curzon G. (1990). Effect of transient cerebral ischaemia and cardiac arrest on brain extracellular dopamine and serotonin as determined by in vivo dialysis in the rat. *J Neurochem.*, **55(3)**:937-40.
32. Shin SS., Bray ER., Zhang CQ. and Dixon CE. (2011). Traumatic brain injury reduces striatal tyrosine hydroxylase activity and potassium-evoked dopamine release in rats. *Brain Res.*, **1369**:208-15.
33. Sarchielli P., Alberti A., Floridi A. and Gallai V. (2002). L-Arginine/nitric oxide pathway in chronic tension-type headache: relation with serotonin content and secretion and glutamate content. *J Neurol Sci.*, **198(1-2)**:9-15.
34. Schoedon G., Schneemann M., Blau N., Edgell CJ. and Schaffner A. (1993). Modulation of human endothelial cell tetrahydrobiopterin synthesis by activating and deactivating cytokines: new perspectives on endothelium-derived relaxing factor. *Biochem Biophys Res Commun.*, **196(3)**:1343-8.
35. Baader SL. and Schilling K. (1996). Glutamate receptors mediate dynamic regulation of nitric oxide synthase expression in cerebellar granule cells. *J Neurosci.*, **16(4)**:1440-9.
36. Chin SY., Pandey KN., Shi SJ., Kobori H., Moreno C. and Navar LG. (1999). Increased activity and expression of Ca(2+)-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. *Am J Physiol.*, **277(5 Pt 2)**:F797-804.
37. Alderton WK., Angell AD., Craig C., Dawson J., Garvey E., Moncada S., Monkhous J., Rees D., Russell LJ., Russell RJ., Schwartz S., Wasldige N. and Knowles RG. (2005). GW274150 and GW273629 are potent and highly selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.*, **145(3)**:301-12.
38. Bozic I., Savic D., Laketa D., Bjelobaba I., Milenkovic I., Pekovic S., Nedeljkovic N. and Lavrnja I. (2015). Benfotiamine attenuates inflammatory response in LPS stimulated BV-2 microglia. *PLoS One.*, **10(2)**:e0118372
39. Kim H., Lee E., Shin T., Chung C. and An N. (1998). Inhibition of the induction of the inducible nitric oxide synthase in murine brain microglial cells by sodium salicylate. *Immunology.*, **95(3)**:389-94.
40. Klasing KC. (1988). Nutritional aspects of leukocytic cytokines. *J Nutr.*, **118(12)**:1436-46.
41. Whicher JT. and Evans SW. (1990). Cytokines in disease. *Clin Chem.*, **36(7)**:1269-81.
42. Nayak D., Huo Y., Kwang WX., Pushparaj PN., Kumar SD., Ling EA. and Dheen ST. (2010).

Sphingosine kinase 1 regulates the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide in activated microglia. *Neuroscience.*, **166**(1):132-44.

43. Watters JJ., Sommer JA., Pfeiffer ZA., Prabhu U., Guerra AN. and Bertics PJ. (2002). A differential role for the mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide signaling: the MEK/ERK pathway is not essential for nitric oxide and interleukin 1beta production. *J Biol Chem.*, **277**(11):9077-87.
44. Speth C., Rambach G., Hagleitner M., Konstanzer K., Höllmüller I., Dierich MP., Mohsenipour I. and Maier H. (2007). Immune response to retroviral infections of the brain. *Front Biosci.*, **12**:1508-19.
45. Barth A., Newell DW., Nguyen LB., Winn HR., Wender R., Meno JR. and Janigro D. (1997). Neurotoxicity in organotypic hippocampal slices mediated by adenosine analogues and nitric oxide. *Brain Res.*, **762**(1-2):79-88.
46. Zhang Y., Zhang J. and Zhao B. (2004). Nitric oxide synthase inhibition prevents neuronal death in the developing visual cortex. *Eur J Neurosci.*, **20**(9):2251-9.
47. Abbadie C., Bhangoo S., De Koninck Y., Malcangio M., Melik-Parsadaniantz S. and White FA. (2009). Chemokines and pain mechanisms. *Brain Res Rev.*, **60**(1):125-34.
48. Ferrari CC., Pott Godoy MC., Tarelli R., Chertoff M., Depino AM. and Pitossi FJ. (2006). Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra. *Neurobiol Dis.*, **24**(1):183-93.
49. Maccioni RB., Rojo LE., Fernández JA. and Kuljis RO. (2009). The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.*, **1153**:240-6.
50. Missale C., Nash SR., Robinson SW., Jaber M. and Caron MG. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.*, **78**(1):189-225.
51. Graham DG. (1978). Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol.*, **14**(4):633-43.
52. Kuhn DM. (1999). Tryptophan hydroxylase regulation. Drug-induced modifications that alter serotonin neuronal function. *Adv Exp Med Biol.*, **467**:19-27.
53. Miura T., Muraoka S. and Fujimoto Y. (1999). Inactivation of creatine kinase induced by dopa and dopamine in the presence of ferrylmyoglobin. *Chem Biol Interact.*, **123**(1):51-61.
54. Whitehead RE., Ferrer JV., Javitch JA. and Justice JB. (2001). Reaction of oxidized dopamine with endogenous cysteine residues in the human dopamine transporter. *J Neurochem.*, **76**(4):1242-51.
55. Paz MA., Flückiger R., Boak A., Kagan HM. and Gallop PM. (1991). Specific detection of quinoproteins by redox-cycling staining. *J Biol Chem.*, **266**(2):689-92.
56. Klegeris A., Korkina LG. and Greenfield SA. (1995). Autoxidation of dopamine: a comparison of luminescent and spectrophotometric detection in basic solutions. *Free Radic Biol Med.*,

18(2):215-22.

57. Stokes AH., Brown BG., Lee CK., Doolittle DJ. and Vrana KE. (1996). Tyrosinase enhances the covalent modification of DNA by dopamine. *Brain Res Mol Brain Res.*, **42(1):167-70.**
58. Filipov NM., Seegal RF. and Lawrence DA. (2005). Manganese potentiates in vitro production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by microglia through a nuclear factor kappa B-dependent mechanism. *Toxicol Sci.*, **84(1):139-48.**
59. Heyen JR., Ye S., Finck BN. and Johnson RW. (2000). Interleukin (IL)-10 inhibits IL-6 production in microglia by preventing activation of NF-kappaB. *Brain Res Mol Brain Res.*, **77(1):138-47.**
60. Carmody RJ. and Chen YH. (2007). Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol.*, **4(1):31-41.**
61. Guha M. and Mackman N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.*, **13(2):85-94.**
62. Hong SS., Lee SA., Han XH., Jin HZ., Lee JH., Lee D., Lee JJ., Hong JT., Kim Y., Ro JS. and Hwang BY. (2007). Kaurane diterpenoids from *Isodon excisus* inhibit LPS-induced NF-kappaB activation and NO production in macrophage RAW264.7 cells. *J Nat Prod.*, **70(4):632-6.**
63. Kim BW., Koppula S., Kim IS., Lim HW., Hong SM., Han SD., Hwang BY. and Choi DK. (2011). Anti-neuroinflammatory activity of Kamebakaurin from *Isodon japonicus* via inhibition of c-Jun NH-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathway in activated microglial cells. *J Pharmacol Sci.*, **116(3):296-308.**
64. Mikenberg I., Widera D., Kaus A., Kaltschmidt B. and Kaltschmidt C. (2007). Transcription factor NF-kappaB is transported to the nucleus via cytoplasmic dynein/dynactin motor complex in hippocampal neurons. *PLoS One.*, **2(7):e589.**
65. Bachstetter AD. and Van Eldik LJ. (2010). The p38 MAP Kinase Family as Regulators of Proinflammatory Cytokine Production in Degenerative Diseases of the CNS. *Aging Dis.*, **1(3):199-211.**
66. Itoh S., Itoh F., Goumans MJ. and Ten Dijke P. (2000). Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem.*, **267(24):6954-67.**
67. Becker JB., Castañeda E., Robinson TE. and Beer ME. (1984). A simple in vitro technique to measure the release of endogenous dopamine and dihydroxyphenylacetic acid from striatal tissue using high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Neurosci Methods.*, **11(1):19-28.**
68. Lévesque D. and Di Paolo T. (1989). Chronic estradiol treatment increases ovariectomized rat striatal D-1 dopamine receptors. *Life Sci.*, **45(19):1813-20.**
69. Färber K., Pannasch U. and Kettenmann H. (2005). Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci.*, **29(1):128-38.**

70. Kabuto H., Tada M. and Kohno M. (2007). Eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. *Biol Pharm Bull.*, **30(3)**:423-7.
71. Yang Z., Wrona MZ. and Dryhurst G. (1997). 5-hydroxy-3-ethylamino-2-oxindole is not formed in rat brain following a neurotoxic dose of methamphetamine: evidence that methamphetamine does not induce the hydroxyl radical-mediated oxidation of serotonin. *J Neurochem.*, **68(5)**:1929-41.
72. Jaimes EA., Nath KA. and Raij L. (1997). Hydrogen peroxide downregulates IL-1-driven mesangial iNOS activity: implications for glomerulonephritis. *Am J Physiol.*, **272(6 Pt 2)**:F721-8.
73. Soliman MK., Mazzio E. and Soliman KF. Levodopa modulating effects of inducible nitric oxide synthase and reactive oxygen species in glioma cells. *Life Sci.*, **72(2)**:185-98.
74. Tseng CY., Chang JF., Wang JS., Chang YJ., Gordon MK. and Chao MW. (2015). Protective Effects of N-Acetyl Cysteine against Diesel Exhaust Particles-Induced Intracellular ROS Generates Pro-Inflammatory Cytokines to Mediate the Vascular Permeability of Capillary-Like Endothelial Tubes. *PLoS One.*, **10(7)**:e0131911.
75. Izumi Y., Sawada H., Yamamoto N., Kume T., Katsuki H., Shimohama S. and Akaike A. (2005). Iron accelerates the conversion of dopamine-oxidized intermediates into melanin and provides protection in SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res.*, **82(1)**:126-37.
76. Khan FH., Sen T. and Chakrabarti S. (2003). Dopamine oxidation products inhibit Na⁺, K⁺-ATPase activity in crude synaptosomal-mitochondrial fraction from rat brain. *Free Radic Res.*, **37(6)**:597-601.
77. Pedrosa R. and Soares-da-Silva P. (2002). Oxidative and non-oxidative mechanisms of neuronal cell death and apoptosis by L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and dopamine. *Br J Pharmacol.*, **137(8)**:1305-13.
78. Ahn KS. and Aggarwal BB. (2005). Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. *Ann N Y Acad Sci.*, **1056**:218-33.
79. Jour'dheuil D., Morise Z., Conner EM., Kurose I. and Grisham MB. (1997). Oxidant-regulation of gene expression in the chronically inflamed intestine. *Keio J Med.*, **46(1)**:10-5.
80. Nam NH. (2006). Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. *Mini Rev Med Chem.*, **6(8)**:945-51
81. Jung HW., Chung YS., Kim YS. and Park YK. (2007). Celastrol inhibits production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through MAPK signal transduction and NF-kappaB in LPS-stimulated BV-2 microglial cells. *Exp Mol Med.*, **39(6)**:715-21.
82. Van Laar VS., Mishizen AJ., Cascio M. and Hastings TG. (2009). Proteomic identification of dopamine-conjugated proteins from isolated rat brain mitochondria and SH-SY5Y cells. *Neurobiol Dis.*, **34(3)**:487-500.

83. Meissner F., Molawi K. and Zychlinsky A. (2010). Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1 β accelerates ALS pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **107**(29):13046-50.
84. Tanaka S., Ishii A., Ohtaki H., Shioda S., Yoshida T. and Numazawa S. (2013). Activation of microglia induces symptoms of Parkinson's disease in wild-type, but not in IL-1 knockout mice. *J Neuroinflammation.*, **10**:143.
85. Tweedie D., Ferguson RA., Fishman K., Frankola KA., Van Praag H., Holloway HW., Luo W., Li Y., Caracciolo L., Russo I., Barlati S., Ray B., Lahiri DK., Bosetti F., Greig NH. and Rosi S. (2012). Tumor necrosis factor- α synthesis inhibitor 3,6'-dithiothalidomide attenuates markers of inflammation, Alzheimer pathology and behavioral deficits in animal models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.*, **9**:106.
86. DAHLSTROEM A. and FUXE K. (1964). EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta Physiol Scand Suppl.*, **232**:1-55.
87. Arenas E., Denham M. and Villaescusa JC. (2015). How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development.*, **142**(11):1918-36.
88. Pappas SS., Tiernan CT., Behrouz B., Jordan CL., Breedlove SM., Goudreau JL. and Lookingland KJ. (2010). Neonatal androgen-dependent sex differences in lumbar spinal cord dopamine concentrations and the number of A11 diencephalospinal dopamine neurons. *J Comp Neurol.*, **518**(13):2423-36.
89. Bedard C., Wallman MJ., Pourcher E., Gould PV., Parent A. and Parent M. (2011). Serotonin and dopamine striatal innervation in Parkinson's disease and Huntington's chorea. *Parkinsonism Relat Disord.*, **17**(8):593-598.
90. Blesa J., Trigo-Damas I., Quiroga-Varela A. and Jackson-Lewis VR. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat.*, **9**:91.
91. Dauer W. and Przedborski S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.*, **39**(6):889-909
92. Nazarali AJ. and Reynolds GP. (1992). Monoamine neurotransmitters and their metabolites in brain regions in Alzheimer's disease: A postmortem study. *Cell Mol Neurobiol.*, **12**(6):581-587
93. Storga D., Vrecko K., Birkmayer JG. and Reibnegger G. (1996). Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of Alzheimer patients. *Neurosci Lett.*, **203**(1):29-32.
94. Winblad B., Hardy J., Backman L. and Nilsson LG. (1985). Memory function and brain biochemistry in normal aging and in senile dementia. *Ann N Y Acad Sci.*, **444**: 255-268.
95. Björkqvist M., Wild EJ., Thiele J., Silvestroni A., Andre R., Lahiri N., Raïbon E., Lee RV., Benn CL., Soulet D., Magnusson A., Woodman B., Landles C., Pouladi MA., Hayden MR.,

- Khalili-Shirazi A., Lowdell MW., Brundin P., Bates GP., Leavitt BR., Möller T. and Tabrizi SJ. (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J. Exp. Med.*, **205**(8):1869–1877.
96. Bové J., Prou D., Perier C. and Przedborski S. (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*, **2**(3):484-94.
 97. Park J., Lim CS., Seo H., Park CA., Zhuo M., Kaang BK. and Lee K. (2015). Pain perception in acute model mice of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Mol Pain*, **11**:28.
 98. Singer TP. and Ramsay RR. (1990). Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. An update. *FEBS Lett.*, **274**(1-2):1-8.
 99. Ago Y., Kawasaki T., Nashida T., Ota Y., Cong Y., Kitamoto M., Takahashi T., Takuma K. and Matsuda T. (2011). SEA0400, a specific Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor, prevents dopaminergic neurotoxicity in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, **61**(8):1441-51.
 100. Ferro MM., Angelucci ME., Anselmo-Franci JA., Canteras NS. and Da Cunha C. (2007). Neuroprotective effect of ketamine/xylazine on two rat models of Parkinson's disease. *Braz J Med Biol Res.*, **40**(1):89-96.
 101. Calne DB., Karoum F., Ruthven CR. and Sandler M. (1969). The metabolism of orally administered L-DOPA in Parkinsonism. *Br J Pharmacol.*, **37**:57–68.
 102. Lloyd KG., Davidson L. and Hornykiewicz O. (1975). The neurochemistry of Parkinson's disease: effect of L-dopa therapy. *J Pharmacol Exp Ther.*, **195**:453–464.
 103. Juorio AV., Li XM., Walz W. and Paterson IA. (1993). Decarboxylation of L-dopa by cultured mouse astrocytes. *Brain Res.*, **626**(1-2):306-9.
 104. Mura A., Jackson D., Manley MS., Young SJ. and Groves PM. (1995). Aromatic L-amino acid decarboxylase immunoreactive cells in the rat striatum: a possible site for the conversion of exogenous L-DOPA to dopamine. *Brain Res.*, **704**(1):51-60.
 105. Siow YL. and Dakshinamurti K. (1990). Neuronal dopa decarboxylase. *Ann N Y Acad Sci.*, **585**:173-88.
 106. Ohmoto T. and Kishikawa H. (1975). L-dopa therapy combined with peripheral decarboxylase inhibitor (MK-486) in Parkinsonism. *Folia Psychiatr Neurol Jpn.*, **29**(1):1-12.
 107. Kurauchi Y., Hisatsune A., Isohama Y., Mishima S. and Katsuki H. (2012). Caffeic acid phenethyl ester protects nigral dopaminergic neurons via dual mechanisms involving haem oxygenase-1 and brain-derived neurotrophic factor. *Br J Pharmacol.*, **166**(3):1151-68.
 108. Brooks AI., Chadwick CA., Gelbard HA., Cory-Slechta DA. and Federoff HJ. (1999). Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res.*, **823**(1-2):1–10.

109. Sedelis M., Schwarting RK. and Huston JP. (2001). Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res.*, **125(1-2)**:109-125.
110. Chen J., Buchanan JB., Sparkman NL., Godbout JP., Freund GG. and Johnson RW. (2008). Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. *Brain Behav Immun.*, **22(3)**:301-11.
111. Henry CJ., Huang Y., Wynne A., Hanke M., Himler J., Bailey MT., Sheridan JF. and Godbout JP. (2008). Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *J Neuroinflammation.*, **5**:15.
112. Thompson WL., Karpus WJ. and Van Eldik LJ. (2008). MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. *J Neuroinflammation.*, **5**:35.
113. Ciesielska A., Sharma N., Beyer J., Forsayeth J. and Bankiewicz K. (2015). Carbidopa-based modulation of the functional effect of the AAV2-hAADC gene therapy in 6-OHDA lesioned rats. *PLoS One.*, **10(4)**:e0122708.
114. Ifuku M., Katafuchi T., Mawatari S., Noda M., Miake K., Sugiyama M. and Fujino T. (2012). Anti-inflammatory/anti-amyloidogenic effects of plasmalogens in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in adult mice. *J Neuroinflammation.*, **9**:197.
115. Lee YJ., Choi DY., Choi IS., Kim KH., Kim YH., Kim HM., Lee K., Cho WG., Jung JK., Han SB., Han JY., Nam SY., Yun YW., Jeong JH., Oh KW. and Hong JT. (2012). Inhibitory effect of 4-O-methylhonokiol on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, amyloidogenesis and memory impairment via inhibition of nuclear factor-kappaB in vitro and in vivo models. *J Neuroinflammation.*, **9**:35
116. Fahn S., Oakes D., Shoulson I., Kieburtz K., Rudolph A., Lang A., Olanow CW., Tanner C. and Marek K. (2004). Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med.*, **351(24)**:2498-508.
117. Gómez-Gálvez Y., Palomo-Garo C., Fernández-Ruiz J. and García C. (2016). Potential of the cannabinoid CB2 receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, **64**:200-8.
118. Hunter RL., Cheng B., Choi DY., Liu M., Liu S., Cass WA. and Bing G. (2009). Intrastriatal lipopolysaccharide injection induces parkinsonism in C57/B6 mice. *J Neurosci Res.*, **87(8)**:1913-21.
119. Hunter RL., Dragicevic N., Seifert K., Choi DY., Liu M., Kim HC., Cass WA., Sullivan PG. and Bing G. (2007). Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *J Neurochem.*, **100(5)**:1375-86

120. Zhang Z., Zhang K., Du X. and Li Y. (2012). Neuroprotection of desferrioxamine in lipopolysaccharide-induced nigrostriatal dopamine neuron degeneration. *Mol Med Rep.*, **5(2)**:562-6.
121. Basma AN., Morris EJ., Nicklas WJ. and Geller HM. (1995). L-dopa cytotoxicity to PC12 cells in culture is via its autoxidation. *J Neurochem.*, **64(2)**:825-32.
122. Mendez JS. and Finn BW. (1975). Use of 6-hydroxydopamine to create lesions in catecholamine neurons in rats. *J Neurosurg.*, **42(2)**:166-73.
123. Banati RB., Daniel SE. and Blunt SB. (1998). Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Mov Disord.*, **13(2)**:221-7
124. Gray R., Ives N., Rick C., Patel S., Gray A., Jenkinson C., McIntosh E., Wheatley K., Williams A. and Clarke CE. (2014). Long-term effectiveness of dopamine agonists and monoamine oxidase B inhibitors compared with levodopa as initial treatment for Parkinson's disease (PD MED): a large, open-label, pragmatic randomised trial. *Lancet.*, 384(9949):1196-205.
125. Lue LF., Kuo YM., Beach T. and Walker DG. (2010). Microglia activation and anti-inflammatory regulation in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.*, **41(2-3)**:115-28.
126. Sapp E., Kegel KB., Aronin N., Hashikawa T., Uchiyama Y., Tohyama K., Bhide PG., Vonsattel JP. and DiFiglia M. (2001). Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol.*, **60(2)**:161-72.
127. Björkqvist M., Wild EJ., Thiele J., Silvestroni A., Andre R., Lahiri N., Raibon E., Lee RV., Benn CL., Soulet D., Magnusson A., Woodman B., Landles C., Pouladi MA., Hayden MR., Khalili-Shirazi A., Lowdell MW., Brundin P., Bates GP., Leavitt BR., Möller T. and Tabrizi SJ. (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J. Exp. Med.*, **205(8)**:1869–1877.
128. Tobinick E., Gross H., Weinberger A. and Cohen H. (2006). TNF-alpha modulation for treatment of Alzheimer's disease: a 6-month pilot study. *MedGenMed.*, **8(2)**:25.
129. Hsiao HY., Chiu FL., Chen CM., Wu YR., Chen HM., Chen YC., Kuo HC. and Chern Y. (2014). Inhibition of soluble tumor necrosis factor is therapeutic in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.*, **23(16)**:4328-44.
130. Papadimitriou D., Le Verche V., Jacquier A., Ikiz B., Przedborski S. and Re DB. (2010). Inflammation in ALS and SMA: sorting out the good from the evil. *Neurobiol Dis.*, **37(3)**:493-502.
131. Prins M., Eriksson C., Wierinckx A., Bol JG., Binnekade R., Tilders FJ. and Van Dam AM. (2013). Interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist appear in grey matter additionally to white matter lesions during experimental multiple sclerosis. *PLoS One.*, **8(12)**:e83835.
132. Sharief MK. and Hentges R. (1991). Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med.*, **325(7)**:467-72.

133. Martin D. and Near SL. (1995). Protective effect of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on experimental allergic encephalomyelitis in rats. *J Neuroimmunol.*, **61**(2):241-5.
134. Kurauchi Y., Hisatsune A., Isohama. and Katsuki H. (2009). Nitric oxide-cyclic GMP signaling pathway limits inflammatory degeneration of midbrain dopaminergic neurons: cell type-specific regulation of heme oxygenase-1 expression. *Neuroscience.*, **158**(2):856-66.
135. Komine O. and Yamanaka K. (2015). Neuroinflammation in motor neuron disease. *Nagoya J Med Sci.*, **77**(4):537-49.

